

**Versuche zur Erkennung der chemischen Auslösung  
von Non-disjunction an  
Metaphase-II-Oozyten und präimplantativen Embryonen  
der Maus**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Fakultät für Biologie  
der**

**Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau**

---

**vorgelegt von  
Zeki Turan  
aus Iğdır/Türkei**

**1981**

---



**Versuche zur Erkennung der chemischen Auslösung  
von Non-disjunction an  
Metaphase-II-Oozyten und präimplantativen Embryonen  
der Maus**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Fakultät für Biologie  
der  
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau**



**vorgelegt von  
Zeki Turan  
aus Iğdır/Türkei**

**1981**

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| Dekan:             | Prof. Dr. G. Feix   |
| Leiter der Arbeit: | Prof. Dr. C. Bresch |
| Referent:          | Prof. Dr. C. Bresch |
| Korreferent:       | Prof. Dr. U. Wolf   |

Tag der Verkündung des Prüfungsergebnisses: 19. 2. 1981



## ZUSAMMENFASSUNG

Wegen der enormen Bedeutung von meiotischen Chromosomenfehlverteilungen (Non-disjunction, ND) für den Menschen sollten die Möglichkeiten eines spezifischen Mutagenitätstests im Rahmen einer routinemäßigen Substanzprüfung untersucht werden. Dazu wurden im Metaphase-II-Oozytentest an der Maus, der als Säugertest gerade die besonders häufigen Verteilungsstörungen der ersten meiotischen Teilung erfaßt, 11 Substanzen an insgesamt 11372 MII-Oozyten untersucht, von denen 7318 für eine numerische Chromosomenanalyse auswertbar waren.

Bei der Analyse der MII-Oozyten zeigte der Mäuse-Inzuchtstamm C3H eine hohe Spontanrate von Metaphasen mit überzähligen Chromosomen (Hyperhaploidien), nämlich  $7 \times 10^{-3}$ . Die  $F_1$ -Hybriden dieses Stammes mit dem Stamm C57Bl wiesen dagegen eine sehr viel niedrigere Spontanrate auf: ungefähr  $2 \times 10^{-4}$ . Die Substanzprüfungen wurden sämtlich an diesen  $F_1$ -Hybriden vorgenommen.

7 Substanzen wurden untersucht, weil sie als ND-Auslöser an Pilzen beschrieben worden waren: para-Fluor-Phenylalanin, Sulfacetamid, Aminopterin, Trimethoprim, Esidrix, Nitrofurantoin und Entero-Vioform. Nur eine von ihnen, Sulfacetamid, löste auch in den MII-Oozyten meßbar Non-disjunction aus (2 Hyperhaploidien in 574 auswertbaren Metaphasen). Für die anderen Substanzen zeigte sich keine ND-auslösende Wirkung, doch könnten einige von ihnen eine chromosomenbrechende Wirkung haben.

Von den 4 weiteren geprüften Chemikalien bestätigte sich ortho-Phenylendiamin als chromosomenbrechend. Eine Wirkung von Kelfizin als Chromosomenbrecher und von Cyclophosphamid als ND-Auslöser und/oder Chromosomenbrecher war nicht auszuschließen. Colchicin erwies sich - wie nicht anders erwartet - als überaus starker Auslöser von numerischen Chromosomenaberrationen (24/156, d.h. 15 % Hyperhaploidien).

Dieser starke ND-Auslöser wurde in Embryonen bis zum Blastocystenstadium weiteruntersucht. Dabei zeigte sich überraschenderweise, daß Colchicin hier im Vergleich zum MII-Test zu einer weiteren Erhöhung der numerischen Chromosomenaberrationen führte, wobei diese Steigerung allerdings hauptsächlich auf Colchicin-induzierte Störungen des Befruchtungsmechanismus zurückzuführen war.

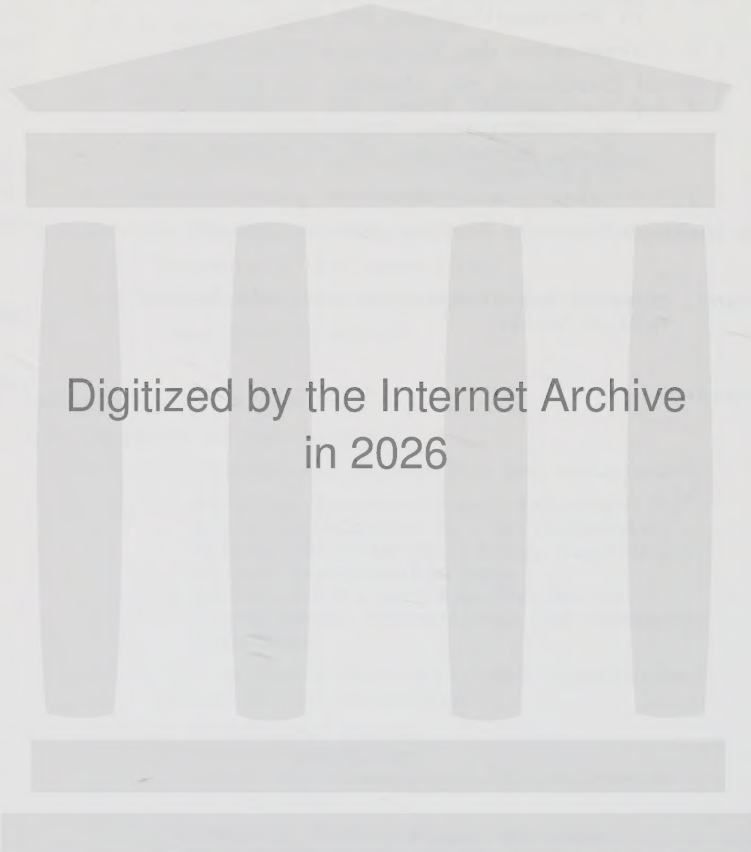
Gründe für die geringe Korrelation zwischen den Ergebnissen der 7 an Pilzen und Mäuse-Oozyten geprüften Substanzen werden diskutiert. Die Ergebnisse deuten an, daß sich die besonders gefährlichen starken Non-disjunction-Auslöser an (C3HxC57Bl)F<sub>1</sub>-Hybridmäusen durch eine Analyse von etwa 500 MII-Oozyten pro Substanz erkennen lassen. Trotz dieses relativ großen Arbeitszeit- und Kostenaufwandes scheint der Einsatz des Metaphase-II-Oozytentests wegen seiner großen Aussagekraft in der routinemäßigen Substanzprüfung gerechtfertigt.

INHALT

|                                                                                                                          | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung und allgemeine Problemstellung                                                                             | 1     |
| 1.1 Chemische Mutagenese                                                                                                 | 1     |
| 1.2 Non-disjunction                                                                                                      | 4     |
| 1.3 Oozytentest                                                                                                          | 6     |
| 1.4 Spezielle Aufgabenstellung                                                                                           | 7     |
| 2. Material und Methoden                                                                                                 | 9     |
| 2.1 Die Reproduktion bei der Maus                                                                                        | 9     |
| 2.1.1 Geschlechtsorgane der weiblichen Maus                                                                              | 9     |
| 2.1.2 Meioseablauf in der weiblichen Maus                                                                                | 10    |
| 2.1.3 Die Paarung der Mäuse                                                                                              | 16    |
| 2.1.4 Embryonalentwicklung                                                                                               | 16    |
| 2.2 Techniken zum Gewinnen und Aufarbeiten von<br>MII-Oozyten und Embryonen                                              | 18    |
| 2.2.1 Benutzte Mäusestämme                                                                                               | 18    |
| 2.2.2 Stimulation der Ovulation durch Hormone                                                                            | 18    |
| 2.2.3 Weitere Arbeitsschritte in den Versuchen<br>an Embryonen                                                           | 20    |
| 2.2.4 Herausnahme der Geschlechtsorgane und<br>Gewinnen der Eier und Embryonen                                           | 24    |
| 2.2.4.1 MII-Oozyten                                                                                                      | 24    |
| 2.2.4.2 Embryonen                                                                                                        | 25    |
| 2.2.5 Präparation der Eier bzw. Embryonen<br>durch Lufttrocknen                                                          | 30    |
| 2.2.5.1 Hypotone Behandlung                                                                                              | 30    |
| 2.2.5.2 Fixierung                                                                                                        | 30    |
| 2.2.6 Färbung                                                                                                            | 31    |
| 2.3 Prüfsubstanzen und ihre Applikation: Stadien-<br>sensitivität, Toxizitätsversuche, Liste der<br>geprüften Substanzen | 32    |
| 3. Ergebnisse                                                                                                            | 39    |
| 3.1 Ergebnisse mit MII-Oozyten                                                                                           | 39    |
| 3.1.1 Kontrollversuche mit F <sub>1</sub> -Mäusen                                                                        | 39    |
| 3.1.2 Testversuche mit F <sub>1</sub> -Mäusen unter Verwendung<br>von Cyclophosphamid                                    | 39    |

|                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.3 Kontrollversuche mit C3H-Mäusen                                                                                                                     | 48  |
| 3.1.4 Testversuche mit C3H-Mäusen unter Ver-<br>wendung von Cyclophosphamid                                                                               | 48  |
| 3.1.5 Ergebnisse mit para-Fluor-Phenylalanin                                                                                                              | 58  |
| 3.1.6 Ergebnisse mit Sulfacetamid                                                                                                                         | 58  |
| 3.1.7 Ergebnisse mit Aminopterin                                                                                                                          | 65  |
| 3.1.8 Ergebnisse mit Trimethoprim                                                                                                                         | 65  |
| 3.1.9 Ergebnisse mit Esidrix                                                                                                                              | 69  |
| 3.1.10 Ergebnisse mit Kelfizin                                                                                                                            | 69  |
| 3.1.11 Ergebnisse mit Nitrofurantoin                                                                                                                      | 69  |
| 3.1.12 Ergebnisse mit Entero-Vioform                                                                                                                      | 70  |
| 3.1.13 Ergebnisse mit ortho-Phenylendiamin                                                                                                                | 70  |
| 3.1.14 Ergebnisse mit Colchicin                                                                                                                           | 79  |
| 3.2 Untersuchungen an Embryonen                                                                                                                           | 84  |
| 3.2.1 Ergebnisse der Kontrolle                                                                                                                            | 84  |
| 3.2.2 Ergebnisse an Embryonen unter Verwen-<br>dung von Colchicin                                                                                         | 88  |
| 4. Diskussion der Ergebnisse                                                                                                                              | 103 |
| 4.1 Versuche an MII-Oozyten                                                                                                                               | 103 |
| 4.1.1 Kriterien zur Auswertung der Metaphasen                                                                                                             | 103 |
| 4.1.1.1 Gestörte Eientwicklung: Störungen in<br>der Polkörperbildung, verlangsamter<br>Verlauf der Eientwicklung, degenerier-<br>te und geschrumpfte Eier | 103 |
| 4.1.1.2 Hypohaploidie und Hyperhaploidie                                                                                                                  | 105 |
| 4.1.1.3 Chromosomen, Chromatiden und Chromoso-<br>menstücke                                                                                               | 107 |
| 4.1.2 Die spontane Häufigkeit der Hyperhaplo-<br>idien in MII-Keimzellen                                                                                  | 107 |
| 4.1.2.1 Technische Fragen                                                                                                                                 | 109 |
| 4.1.2.2 Hormon-Behandlung                                                                                                                                 | 111 |
| 4.1.2.3 Alter der behandelten Mäuseweibchen                                                                                                               | 112 |
| 4.1.2.4 Mäusestämme                                                                                                                                       | 113 |
| 4.1.3 Diskussion verschiedener Mutagene<br>(eigene und Literaturdaten)                                                                                    | 114 |
| 4.1.3.1 Cyclophosphamid                                                                                                                                   | 114 |
| 4.1.3.2 para-Fluor-Phenylalanin                                                                                                                           | 115 |
| 4.1.3.3 Sulfacetamid                                                                                                                                      | 116 |
| 4.1.3.4 Aminopterin                                                                                                                                       | 116 |
| 4.1.3.5 Trimethoprim                                                                                                                                      | 116 |
| 4.1.3.6 Esidrix                                                                                                                                           | 117 |
| 4.1.3.7 Kelfizin                                                                                                                                          | 117 |
| 4.1.3.8 Nitrofurantoin                                                                                                                                    | 117 |

|          |                                                                                                                         |     |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.3.9  | Entero-Vioform                                                                                                          | 117 |
| 4.1.3.10 | ortho-Phenylendiamin                                                                                                    | 118 |
| 4.1.3.11 | Colchicin                                                                                                               | 118 |
| 4.2      | Diskussion der Ergebnisse an Mäuseembryonen                                                                             | 119 |
| 4.2.1    | Kriterien zur Auswertung                                                                                                | 119 |
| 4.2.2    | Spontane Häufigkeit der Aneuploidien<br>in Embryonalstadien der Maus                                                    | 119 |
| 4.2.3    | Diskussion der Colchicin-Ergebnisse                                                                                     | 124 |
| 4.2.3.1  | Colchicin zum Stoppen der Metaphasen                                                                                    | 124 |
| 4.2.3.2  | Vorkommende Anomalien: Zurückgebliebene Embryonen, Haploidien, Triploidien, Monosomien und Trisomien (Non-disjunction). | 125 |
| 4.2.3.3  | Selektion in utero                                                                                                      | 128 |
| 4.3      | Zusammenfassende Wertung der Ergebnisse                                                                                 | 130 |
| 5.       | Anhang: Eignung des MII-Oozytentests als Routine-<br>Prüfverfahren                                                      | 136 |
| 6.       | Literatur                                                                                                               | 139 |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41543125\\_0002](https://archive.org/details/IA41543125_0002)

## 1. EINLEITUNG UND ALLGEMEINE PROBLEMSTELLUNG

### 1.1 Chemische Mutagenese

Es bestehen keine Zweifel, daß Mutationen, die zu Mißbildungen und Erb-leiden führen, auch in menschlichen Genomen induziert werden können. Dementsprechend hält man den Einsatz genetisch nicht überprüfter Chemikalien und deren ständig wachsende Vielfalt und Menge für eine ernste Bedrohung der menschlichen Erbsubstanz. Täglich nimmt der Mensch aus seiner Umgebung bewußt oder unbewußt eine Vielfalt körperfremder Stoffe auf (etwa durch Lebensmittel, Konservierungsmittel, Genußmittel, Suchtgifte, Arzneimitteln, Pflanzenschutzmittel, Farbstoffe ; hierzu kommen alle jene Chemikalien, die in der industriellen Fertigung gebraucht und immer neu entwickelt werden). Eine Reihe dieser Stoffe aus unserer Umwelt werden heute schon allgemein als gesundheitsschädlich betrachtet, obwohl die meisten Stoffe noch nicht genauer untersucht sind bzw. sich keine genauen Aussagen über das durch sie erzeugte Ausmaß der Schäden beim Menschen machen lassen. Besonders schwierig scheint es, die quantitative Beziehung zwischen Schadstoffkonzentrationen und aufgetretenen Defekten bzw. Krankheiten zu bestimmen, was sich auch im fortwährenden Streit um Maximaldosen von sogenannten Umweltgiften ausdrückt. Es ist nämlich ziemlich schwer, die ursächliche Beziehung zwischen Chemikalieneinwirkung und Schädigung des Genoms beim Menschen nachzuweisen.

Da der Mutationsnachweis beim Menschen also häufig nicht oder nicht gleich möglich ist, müssen zur Mutagenitätsprüfung Testsysteme herangezogen werden, die mit Tieren arbeiten. Zu diesem Zweck werden Prüflabors eingerichtet, die der Erprobung und Verbesserung sowie der Entwicklung neuer Mutagenitätstests dienen. Man braucht viele verschiedene Testsysteme, da sich mit einem einzigen Testsystem nicht alle Mutationstypen erfassen lassen.

Es gibt folgende Mutationstypen (1):

- a) Gen- oder Punktmutationen: Mikroskopisch nicht sichtbare Veränderungen, die sich im molekularen Bereich abspielen und zur Entstehung neuer Allele führen.
- b) Chromosomenmutationen: Strukturelle Veränderungen an den Chromosomen, die mit zytologischen und/oder genetischen Methoden nachweisbar sind. Als Folge dieser Veränderungen werden entweder die Kopplungsbeziehungen der Gene der betroffenen Chromosomen verändert oder Chromosomensegmente gehen verloren bzw. werden hinzugefügt.
- c) Genommutationen: Hierunter versteht man numerische Chromosomenaberrationen, z.B. Veränderungen in der Zahl der Chromosomen (Aneuploidien) oder ganzer Chromosomensätze (Ploidien).

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Testsysteme und die von ihnen erfaßten Mutationstypen an.

Tab. 1  
(aus: Lit. 2)

CHARAKTERISTISCHE MERKMALE EINIGER MUTAGENITÄTESTS

| Test                                    | Organismus                | target-Zelle                                            | Säuger-<br>Pharmako-<br>kinetik | Säuger-Metabolismus               | erfasste<br>Mutationen                                    |
|-----------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Ames-Test                               | Salmonella<br>typhimurium | Bakterienzelle                                          | -                               | simuliert durch<br>Leberhomogenat | Genmutationen                                             |
| Basic-Test                              | Fruchtfliege              | Keimzelle                                               | -                               | bedingt vorhanden                 | Genmutationen                                             |
| Mikrokern-Test                          | Maus                      | Knochenmark, Em-<br>bryozellen (soma-<br>tische Zellen) | +                               | +                                 | Chromosomenmutationen                                     |
| SCP-Test                                | Maus                      | Knochenmark (so-<br>matische Zellen)                    | +                               | +                                 | nicht-bleibende, sondern<br>reparierte DNA-Veränderungen? |
| Spermomorphologie-<br>Test              | Maus                      | Spermien (Keim-<br>zelle)                               | +                               | +                                 | Genmutationen?                                            |
| Fellflecken-Test                        | Maus                      | embryonale pigment-<br>zellen (somatische<br>Zellen)    | +                               | +                                 | Genmutationen                                             |
| Genmutationstest<br>in Zellkultur       | Maus, Hamster,<br>Mensch  | somatische Zellen<br>in Kultur                          | -                               | simuliert durch<br>Leberhomogenat | Genmutationen                                             |
| Oocyten-Test                            | Maus                      | Eizellen (Keimzelle)                                    | +                               | +                                 | Chromosomenmutationen                                     |
| Histokompatibili-<br>tätst-Test         | Maus                      |                                                         |                                 |                                   |                                                           |
| Dominant-Letal-<br>Test                 | Maus, Ratte               | Spermien (Keimzelle)                                    | +                               | +                                 | Letalmutationen (Chromosomen-<br>mutationen)              |
| Spezifischer Lokus-<br>Test             | Maus                      | Spermien (Keimzelle)                                    | +                               | +                                 | Genmutationen                                             |
| Cyto genetischer Test<br>an Lymphocyten | Mensch                    | Lymphocyten (soma-<br>tische Zellen)                    | +                               | +                                 | Chromosomenmutationen                                     |

Zur Untersuchung der Mutagenität von Chemikalien werden meist Testsysteme an Mikroorganismen oder an niederen Organismen herangezogen. Es ist allerdings ein alter Streitpunkt, ob man aufgrund der nachgewiesenen Mutagenität einer Substanz an Mikroorganismen tatsächlich schon eine Gefahr für den Menschen ableiten kann, denn fast alle Substanzen werden nach ihrer Aufnahme im menschlichen Organismus zu zahlreichen Zwischen- und Endprodukten um- oder abgebaut. Agentien werden zwar bei Mikroorganismen auch metabolisiert, doch sind die Stoffwechselwege bei diesen Organismen gelegentlich anders als beim Menschen. So kann es vorkommen, daß eine Verbindung, die bei Mikroorganismen mutagen wirkt, beim Menschen keine Wirkung zeigt, oder gar daß eine für Säuger mutagene Substanz im Test mit Mikroorganismen keine Mutagenität erweist (z.B. Dimethyl-N-nitrosamin: bei Bakterien nicht mutagen, beim Säuger mutagen). Um derartigen Einwänden entgegenzutreten, wird zunehmend versucht, Testsysteme zu entwickeln, die, besonders unter stoffwechselphysiologischen und pharmakokinetischen Aspekten, dem Menschen möglichst ähnlich sind. Hierbei kommen besonders Testsysteme mit Säugetieren in Frage, da die Säugetiere phylogenetisch dem Menschen nahe stehen.

Es besteht weiter kein Zweifel, daß die Erfassung mutagener Substanzen mit in vivo Methoden an Säugetieren für den Menschen relevanter ist als in vitro Methoden.

## 1.2 Non-disjunction (ND)

Ein wesentlicher Aspekt der chemischen Mutagenität ist die Erzeugung von Chromosomenaberrationen. Aneuploide Chromosomenaberrationen sind Folge meiotischer oder mitotischer Verteilungsstörungen während der Zellteilung infolge sich nicht trennender homologer Chromosomen. Man nennt diesen Mechanismus Non-disjunction (ND).

Normalerweise wird von den homologen Chromosomen je eines auf die beiden Tochterzellen verteilt. Im Falle der ND wandern diese Chromosomen nicht auseinander, sondern fallen einer der

beiden Zellen zu. So enthält die eine Zelle ein Chromosom zuwenig (Hypoploidie) und die andere eines zuviel (Hyperploidie). Solche Verteilungsstörungen können vorkommen, wenn die Chromosomenpaarung ausbleibt oder das Chiasma sich vorzeitig löst, so daß eine zufällsmäßige Verteilung erfolgt, oder wenn die Bildung von Spindel- bzw. Chromosomenverteilungsapparat gestört ist.

Erfolgt die ND in der Keimbahn (also als mitotische ND in den Oogonien oder Spermatogonien oder als meiotische ND in der 1. oder 2. meiotischen Teilung), so entstehen aneuploide Gameten und nach Befruchtung aneuploide Zygoten. Die Wichtigkeit derartiger Genommutationen für den Menschen zeigt sich in ihrer Häufigkeit: 50 % der frühen Spontanaborte sind chromosomal abnormal. Der Hälfte dieser Spontanaborte liegt eine Non-disjunction zugrunde (3). Das zeigt, wie stark die Selektion in utero gegen aneuploide Embryonen ist. Trotzdem gibt es beim Menschen einige Aneuploidien, die bis zur Geburt und auch darüber hinaus lebensfähig sind. Neben verschiedenen Geschlechtschromosomenaberrationen sind das hauptsächlich die Trisomien der autosomalen Chromosomen 21, 18 und 13 (insgesamt ca. 3-4 auf 1000 Geburten). Da die meisten Aneuploidien starke körperliche und geistige Schäden bewirken, darf die Bedeutung der ND für den Menschen nicht unterschätzt werden.

Zu den Ursachen von ND werden verschiedene Faktoren gezählt: chemische Einflüsse (mutagene Chemikalien), physikalische Einflüsse (ionisierende Strahlen), Infektionen durch Viren, Hormone, Alter, verzögerte Befruchtung, Temperatur und Jahreszeiten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Induktion von ND unter Einfluß von chemischen Substanzen, da die Agentien, die ND erzeugen, als gefährliche potentielle Mutagene für den Menschen betrachtet werden.

### 1.3 Oozyten-Test

Hinsichtlich der genetischen Gefährdung künftiger Generationen sind Untersuchungen selbstverständlich dann am aussagekräftigsten, wenn die mutagene Wirkung der Substanzen direkt an Keimzellen geprüft wird.

Nach Wolf und Engel (4) finden sich zahlreiche Hinweise dafür, daß das embryonale Genom selbst zunächst genetisch inaktiv ist und die embryonalen Gene stufenweise erst kurz vor der Implantation aktiviert werden. Es ist ebenfalls bekannt, daß sich genetische Defekte umso einschneidender auswirken, je früher in der Individualentwicklung das betreffende Gen benötigt wird. Bewirkt eine Mutation also eine Störung im frisch befruchteten Ei, so ist mit einer gravierenderen Auswirkung zu rechnen, als wenn sie in späteren Entwicklungsstadien oder gar nach der Geburt auf den Organismus einwirkt und dann unter Umständen nicht erkennbar ist. Aus diesen Gründen ist es von großer Bedeutung, die frühen Entwicklungsphasen des Individuums auf genetische Schäden zu untersuchen.

Eines der für diesen Zweck entwickelten Testsysteme ist der sogenannte Oozyten-Test. Mit diesem Testsystem können die in verschiedenen Stadien der Keimzellenentwicklung von Weibchen chemisch erzeugten Chromosomenaberrationen in verschiedenen Zellteilungsstadien zytogenetisch analysiert werden. Zu den für die zytogenetische Analyse besonders geeigneten Zellteilungsstadien gehören Metaphase I und Metaphase II der Meiose (MI- und MII-Oozyten) sowie frühe Furchungsstadien der Keimesentwicklung.

Welches ist nun das empfindlichste Stadium für die ND-Auflösung? Tragen Männchen und Weibchen gleichermaßen zur Aneuploidie bei? Aus der starken Abhängigkeit der ND-Rate vom Alter der Mutter (5) und aus der Strukturanalyse der bestimmten überzähligen Chromosomen im Vergleich mit väterlichem und mütterlichem Chromosomensatz (6,7,8) geht hervor, daß ca. 2/3 der ND-Fälle beim Menschen auf Verteilungsstörungen in der mütterlichen Meiose zurückzuführen sind. Daher ist der Oozyten-Test zur Untersuchung der ND von größerer Bedeutung als der Spermatozyten-Test. Außer-

dem zeigt die Strukturanalyse mancher trisomischen Chromosomen auch, daß diese Verteilungsstörungen beim Menschen meistens (für Trisomie 21 ca. 90 %) in der MI der Meiose der Mutter ausgelöst werden (6,7,8,9). Deshalb sollte die Behandlung der weiblichen Maus mit Prüfsubstanzen kurz vor der Metaphase I der Meiose unter-  
nommen werden.

#### 1.4 Spezielle Aufgabenstellung

Während rezessive Mutationen sich zunächst unbemerkt im Erbgut der menschlichen Population anhäufen und erst in späteren Generationen - wenn sie homozygot geworden sind - sichtbar werden, zeigen sich ND-Ereignisse bereits in der Generation nach ihrer Entstehung in ihrem ganzen tragischen Ausmaß.

Um eine solche aktuelle Bedrohung abwenden zu können, ist es notwendig, die ND auslösenden Substanzen rechtzeitig zu erkennen. Dazu wurden bereits verschiedene Prüfsysteme an Pilzen und Säugern entworfen. Die Pilztests arbeiten schnell und unaufwendig, doch bleibt die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen offen. Diese Frage stellt sich nicht in demselben Grad für ND-Tests an Säugetieren. Allerdings sind diese Prüfsysteme noch nicht so gut ausgearbeitet. Daher sollte in dieser Arbeit die Eignung des Mäuse-MII-Oozyten-Tests als Routineverfahren in der Mutagenitätsprüfung untersucht werden.

Um festzustellen, wie weit der Oozyten-Test diese Aufgabe übernehmen kann, wurden zur Prüfung Substanzen ausgewählt, die entweder bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als ND-Auslöser gefunden worden waren: Folsäureantagonisten wie Sulfacetamid, Aminopterin, Trimethoprim; Aminosäureanaloge wie p-Fluor-Phenylalanin (10) oder bei *Aspergillus nidulans* ähnliche mutierende Wirkungen zeigten: Arzneimittel wie Esidrix, Kelfizin, Nitrofurantoin und Entero-Vioform (11). Darüberhinaus sollten zwei weitere Substanzen geprüft werden: ortho-Phenylendiamin, das im Mikrokerntest zytogenetische Aktivität zeigte (12), und das bekannte Spindelgift Colchicin, das bisher im Oozyten-Test noch

nicht untersucht wurde. Zur Eichung des MII-Tests wurde der von Röhrborn und Hansmann (13) im MII-Test gefundene ND-Auslöser Cyclophosphamid verwendet.

Da alle Mäusechromosomen ( $2n = 40$ ) akrozentrisch sind, ist es schwer, strukturelle Chromosomenveränderungen zu identifizieren. Daher wurden bei dieser Arbeit nur numerische Chromosomenaberrationen, darunter speziell Hyperploidien, berücksichtigt, da bei hypoploiden MII-Oozyten ( $< 20$  Chromosomen) nicht zweifelsfrei unterschieden werden kann zwischen präparationsbedingtem Chromosomenverlust und ND. Bei den frühen Embryonen können dagegen sowohl hypo- als auch hyperploide Embryonen ausgewertet werden, wenn mehrere Zellen in der Metaphase für die Auswertung zur Verfügung stehen.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Die Reproduktion bei der Maus

#### 2.1.1 Geschlechtsorgane der weiblichen Maus

##### 2.1.1.1 Die Eierstöcke (Ovarien):

Die Ovarien bestehen aus einer dichter strukturierten Rinde (Cortex) und einem lockerer gebauten Mark (Medulla), sind fast kugelig und wenig gekerbt bei einem Durchmesser von 2 mm. In der Rinde sind allerorts Follikel verschiedener Entwicklungsstufen, von denen jeweils mehrere das gleiche Reifestadium haben, die dann gleichzeitig platzen. Dementsprechend sind auch stets Gelbkörper (corpora lutea) verschiedener Entwicklungsstufen nachweisbar (14,15,16).

##### 2.1.1.2 Der Eileiter (Ovidukt):

An das Ovar schließt sich beckenwärts direkt der Eileiter an. Der Eileiter stellt eine enge gewundene Röhre dar, die den Periovarialraum mit dem Uterus verbindet. Der dem Ovar nächste Teil, die Ampulle, endet in einer trichterförmigen Öffnung (Infundibulum). Der Eileiter mündet in den Uterus (16).

##### 2.1.1.3 Die Gebärmutter (Uterus):

Der Uterus bicornis der Maus ist paarig in sogenannten Uterushörnern angelegt. Diese haben eine Länge von etwa 4 bis 5 cm und verlaufen vom Ovar kommend bogenförmig zur Scheide (15).

##### 2.1.1.4 Die Scheide (Vagina):

Die Vagina ist weit und dorsoventral abgeplattet. Im Verlauf des Zyklus ändert sich der Epithelcharakter (z.B. im Östrus zu fast ausschließlich verhornten Zellen), wodurch die Brunst nachweisbar ist (15).

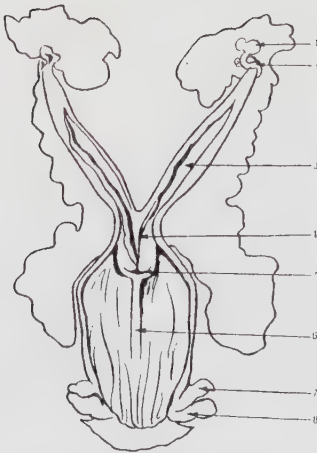
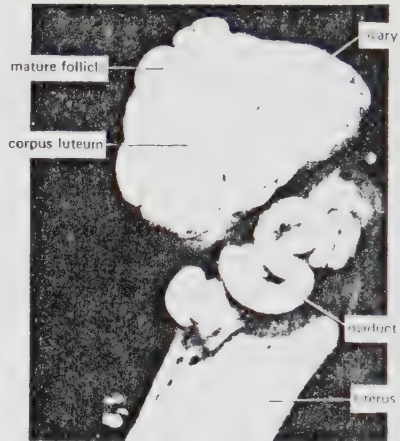


Abb. 49. Maus, weibliche Genitalien, auf-  
geschnitten (aus *Snell*, umgezeichnet)

- |                         |                 |
|-------------------------|-----------------|
| 1 Ovar                  | 5 Zervix        |
| 2 Ovidukt               | 6 Vagina        |
| 3 Lumen des Uterushorns | 7 Klitorisdrüse |
| 4 Corpus uteri          | 8 Klitoris      |

Abb. 1

(Aus: Lit. (16))



ACTIVELY OVULATING MOUSE OVARY

Abb. 2

Aus: Lit. (17)

### 2.1.2 Meioseablauf in der weiblichen Maus

Die weibliche Meiose ist bei allen Säugetieren ein komplizierter Vorgang, der bereits im weiblichen Foetus beginnt, aber erst nach der Befruchtung abgeschlossen wird.

Die Oogenese der Maus kann in drei Stadien unterteilt werden (18):

- I. Prädiktyotän-Stadium: Ursprung der Keimzellen, DNA-Synthese und frühe Prophase der Meiose mit Paarung, Crossing-over, Erscheinen der Chiasmata.
- II. Diktyotän-Stadium: rRNA und mRNA-Synthese während der Follikelreifung.

### III. Postdiktyotän-Stadium:

- a) Präovulatorisches Stadium: Präovulatorische Oozytenreifung mit der ersten meiotischen Reduktionsteilung und Beginn der zweiten meiotischen Teilung.
- b) Ovulatorisches Stadium: Ovulation der Eier und Vollendung der zweiten meiotischen Teilung nach Eindringen des Spermiums.

### I. Prädiktyotän-Stadium:

Oogonien stammen vom Dottersackepithel ab, wo die sogenannten primordialen Keimzellen im 8 Tage alten Mäuseembryo zu finden sind. Von dort aus wandern sie zu den Gonaden.

Borum (19) untersuchte die Entwicklung der weiblichen Gonade der Maus histologisch und zytologisch von der Zeit im fötalen Leben, wo sie identifiziert werden kann, bis zur Zeit, wo alle Keimzellen das Ruhestadium (Diktyotän) der meiotischen Prophase erreicht haben, d.h. bis zum 5. Tag nach der Geburt, die am 21. Tag der Trächtigkeit erfolgt. Das früheste Stadium, in dem die Gonaden identifiziert werden konnten, war der 10. Tag des embryonalen Lebens. Das Geschlecht konnte erst am 13. Tag histologisch unterschieden werden. Am 15. Tag schienen alle Keimzellen im Ovar die Meiose begonnen zu haben.

Vom 13. bis 15. Tag machen die Keimzellen (Oogonien) ihre letzte DNA-Synthese (= prämeiotische DNA-Synthese) und gehen in das Leptotänstadium der Meiose ein. Von diesem Stadium an nennt man diese Zellen Oozyten. 99,7 % der DNA-Synthese findet in der Interphase vor dem Leptotän statt, 0,3 % im Leptotän und Zygotän (18). Die Dauer der prämeiotischen DNA-Synthese der Oozyten von Mäuseembryonen beträgt nach Crone et al. (20) 10,5 - 12 Stunden (S Periode), das Leptotän dauert 3 - 6, das Zygotän 12 - 40, das Pachytän über 60 Stunden. Ab dem 19. Tag des embryonalen Lebens treten die Oozyten in das Diplotänstadium (Chiasmata) ein. Dann beginnt das Diktyotänstadium.

## II. Diktyotän-Stadium:

Zwischen dem ersten und fünften Tag nach der Geburt sind alle nicht-degenerierten Mäuse-Oozyten von Follikelzellen umgeben (Primordialfollikel) und erreichen so das interphaseähnliche Spätdiplotän-Stadium, das auch Diktyotän-Stadium genannt wird.

Im Diktyotän-Stadium während des Follikelwachstums wird die Synthese von ribosomaler RNA und stabiler mRNA beobachtet. Von Oakberg (21) wurde nach einer Injektion von  $^3\text{H}$ -Uridin in weibliche Mäuse schnelle nukleolare und nukleare Markierung mit anschließender Übertragung der Markierung ins Zytoplasma in Oozyten wachsender Follikel festgestellt. Zur Zeit der Antrumbildung hört dies auf. Die Inkorporation stellt offensichtlich eine Synthese von rRNA und mRNA dar, die im Zytoplasma für frühe Furchungsteilungen gespeichert werden. Im Diktyotän-Stadium ruhen die Oozyten dann bis zur Geschlechtsreife (bei der Maus ca. 45 Tage nach der Geburt).

## III. Postdiktyotän-Stadium:

### a) Präovulatorische Oozytenreifung:

In der geschlechtsreifen Maus wird dann bei jedem Östruszyklus die Weiterentwicklung einiger Oozyten hormonell stimuliert. Die Kernmembran löst sich völlig auf, und die Kernspindel beginnt sich auszubilden. Dieses Stadium wird als Prometaphase I bezeichnet.

In der Metaphase I wird die Spindel vervollständigt, und die Bivalente werden in einer Äquatorialplatte angeordnet. In der Anaphase I werden alle 20 Bivalente (Tetraden), unter gleichzeitiger Lösung der Chiasmata, in je zwei Univalente geteilt. Die an die Pole gelangten Chromosomen entspiralisieren sich, und es bildet sich eine Kernmembran. Ein Nukleolus tritt jedoch nicht auf. Durch asymmetrische Aufteilung des Plasmas entstehen so eine Oozyte und der erste Polkörper.

### b) Ovulationsphase:

Sofort nach der ersten meiotischen Teilung geht die Oozyte ohne

neue DNA-Synthese und bei der Maus ohne jede Interphase oder sogar Prophase II in die Prometaphase II über, die einer mitotischen entspricht. In der Metaphase II, oder in einigen Fällen (13 %) schon in der Prometaphase II, findet die Ovulation statt. Nach der Besamung in der Telophase II wird in der 2. Anaphase der zweite Polkörper abgetrennt. Der erste Polkörper teilt sich zu diesem Zeitpunkt auch (wenn noch nicht abgestoßen).

Nach dem Eindringen des Spermiums durchlaufen Ei- und Spermienchromosomen eine Interphase, in der sie getrennt (weiblicher und männlicher Pronukleus) repliziert werden (postmeiotische DNA-Replikationssynthese). In der Prometaphase der ersten Furchungsteilung sind die zwei haploiden Chromosomensätze eng zusammen, aber noch einzeln. Wenn die Spindel fertig ist und die zwei Chromosomensätze in einer gemeinsamen Äquatorialplatte angeordnet sind, wird das als Vollendung der Befruchtung betrachtet (Details in Lit. 18).

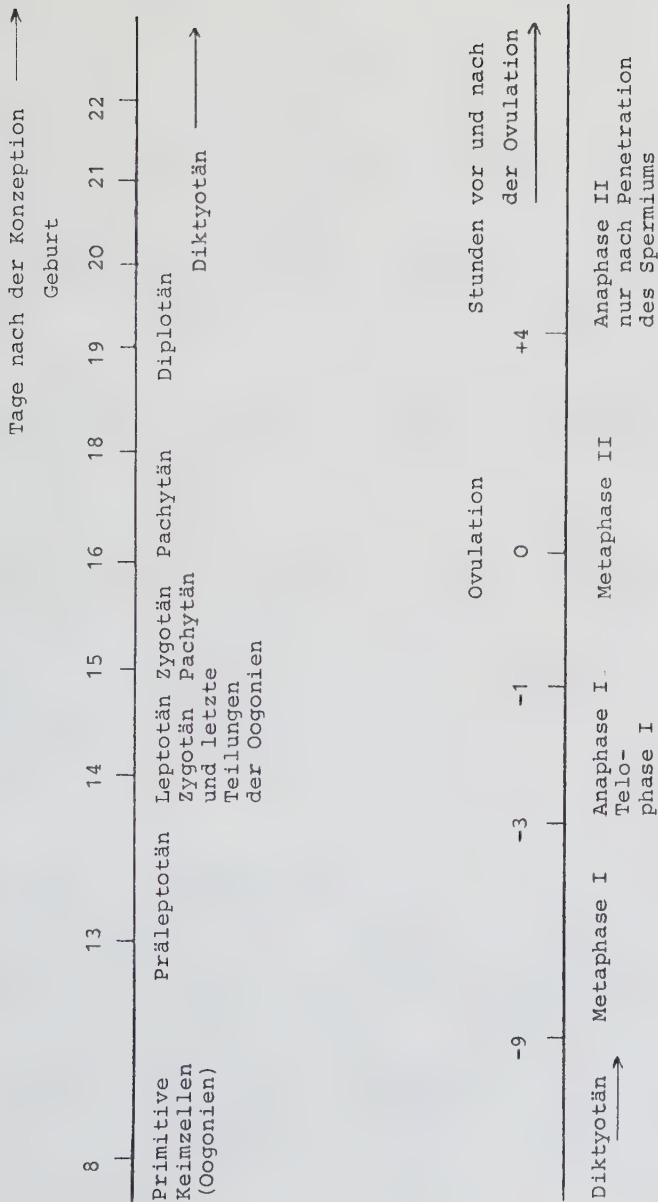
Der Meioseablauf beim Menschen ist dem der Maus ähnlich, nur die Dauer der einzelnen Stadien ist unterschiedlich. Die ersten meiotischen Kerne tauchen im 3. - 4. Monat der Schwangerschaft auf (Leptotän, Zygotän). Die ersten Pachytäne und Diplotäne werden im 7. Monat beobachtet. Im 9. Monat sind alle Oozyten im Diktyotän-Stadium (Wartestadium). Dieser Zustand dauert bis zur Pubertät (ca. 12 - 15 Jahre nach der Geburt), dann wird die jahrelang ruhende Meiose hormonell wieder in Gang gebracht (in der ersten Hälfte jedes Monatszyklus in ca. 10 - 50 Oozyten). Die Befruchtung findet, wie bei der Maus, im Eileiter statt. Dann wird die Meiose zu Ende geführt (22).

Die Annahme, daß noch nach der Geburt aus Oogonien neue Oozyten gebildet werden, wurde widerlegt: Borum (23) gab trächtigen Mäusen 6 oder 7 Injektionen von  $^3\text{H}$ -Thymidin in 12-Stunden-Intervallen vom 12. bis zum 15. Tag nach der Beobachtung eines Vaginalpfropfes. Zu verschiedenen Zeiten nach der Geburt wurden Teile der Ovarien weiblicher Baby-Mäuse für die Autoradiographie präpariert. Markierte Oozytenkerne fand man in allen Ovarien, und zwar zwischen 83 und 100 %. Weibliche Mäuse, denen  $^3\text{H}$ -Thymidin-

Injektion zu verschiedenen Zeiten nach der Geburt gegeben wurde, zeigten dagegen keinen Einbau in ihre Oozytenkerne. Es scheint, daß alle Oozyten im Ovar der erwachsenen Maus seit dem Föten-Stadium überdauert haben. Dies bedeutet, daß die Maus bei der Geburt mit einer begrenzten Anzahl von Oozyten ausgerüstet ist, von denen später die reifen Eier stammen. DNA-Synthese erfolgt nur am Anfang der Meiose und im Pronukleusstadium nach der Befruchtung, nicht jedoch in der Interphase zwischen zwei Meiose-teilungen.

Sirlin und Edwards (24) haben weibliche Mäuse mit  $^{14}\text{C}$ -Adenin injiziert. Eine Markierung der Kern-DNA wurde in Oozyten der Mäuse gefunden, die 2 - 3 Stunden nach der Geburt injiziert waren. Die markierten Oozyten befanden sich im Leptotän und in den späten Stadien. Die Mäuse, die im Alter von 2, 4 und 6 Wochen injiziert, 2 oder 8 Wochen nach der Injektion getötet waren, zeigten keine Markierung der Oozytenkerne. Man fand auch bei den nach PMS- und HCG-Gabe superovulierten Mäusen im Alter von 3-4 Wochen, die mit männlichen Mäusen verpaart waren, die  $^{14}\text{C}$ -Adenin-Markierung im Pronukleus 13 Stunden nach der Ovulation, d.h. die DNA-Synthese findet erst ca. 11 Stunden nach der Penetration des Spermiums statt.

Modell der Oogenese bei der Maus (Nach Lit. 25)



### 2.1.3 Die Paarung der Mäuse

Unter natürlichen Bedingungen zeigen Mäuse ein ausgeprägtes Territorialverhalten. Ein Männchen lebt mit mehreren Weibchen und deren nicht-geschlechtsreifen Jungen zusammen. Das Revier wird gegen fremde Mäuse verteidigt. Dementsprechend sind Männchen auch unter Laborbedingungen erst dann deckbereit, wenn sie ihr Revier kennen, also nach etwa einem Tag in einem neuen Käfig.

Werden mehrere Männchen zusammen in einem Käfig gehalten, so kommt es häufig zu Kämpfen, die die Kopulationsbereitschaft herabsetzen. Mit dem Etablieren einer Rangordnung nimmt die Zahl der Auseinandersetzungen ab.

Mäuse paaren sich ausschließlich während der Brunstzeit der Weibchen. Das Männchen deckt mehrere Male. Nach dem richtigen Decken bleibt in der Vagina ein sogenannter Paarungspfropf zurück, der aus verklumpter Samenflüssigkeit und Vaginalschleim besteht (26). Der Pfropf füllt die Scheide völlig aus und hält etwa 15 - 24 Stunden. Danach löst er sich und fällt heraus (15). Nur wenn der Vaginalpfropf vorhanden ist, können die ejakulierten Spermien die Eier besamen und die Eier sich normal weiterentwickeln. Der Vaginalpfropf verhindert auch weitere Begattungen (27). Die Brunst (= Östrus) dauert einen halben bis einen Tag. Hat keine Begattung stattgefunden, folgt die nächste Brunstperiode nach 4 Tagen (26).

### 2.1.4 Embryonalentwicklung

Erst nach der Kopulation findet der Eisprung statt. Die Spermien, die durch den Uterus in die Ampulle des Eileiters gelangt sind, warten dort auf die Eier. Bei der Ovulation gelangen die Eier (MII-Oozyten) vom Ovar auch in die Ampulle. Dann erfolgt die Befruchtung. Die Zygote beginnt noch im Eileiter die Furchungsteilungen. Gleichzeitig bewegen sich die Embryonen in die Richtung des Uterus. Bis zum 8-Zellstadium sind die Embryonen im Eileiter, dann sind sie im Uterus. Die Implantation erfolgt am fünften Tag der Befruchtung.

Das folgende Schema (aus: Lit. 28) zeigt die Entwicklungsstadien der Embryonen zu verschiedenen Zeiten nach der Befruchtung (die Zeiten beziehen sich auf das Intervall, in dem der betreffende Zellzustand gefunden werden kann).

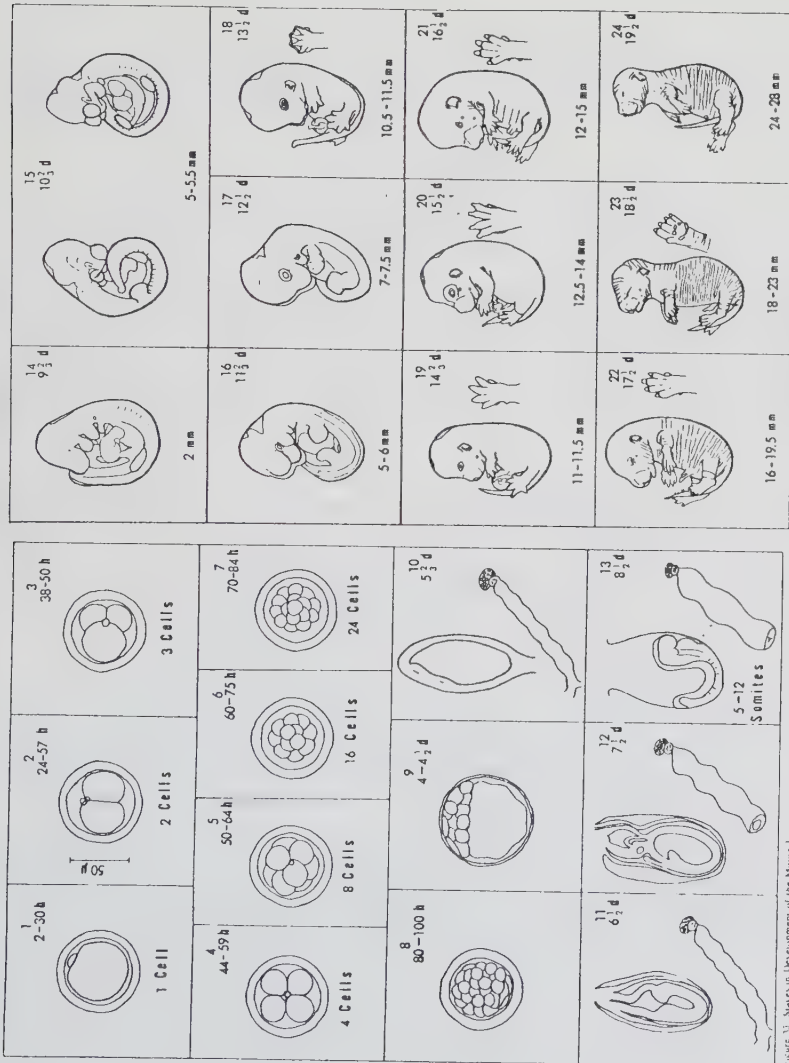


Figure 14. Stages in Development of the Mouse II.

Figure 13. Stages in Development of the Mouse I.

## 2.2 Techniken zum Gewinnen und Aufarbeiten von MII-Oozyten und Embryonen

### 2.2.1 Benutzte Mäusestämme

Es wurden bei dieser Arbeit aus der Stammzucht des Zentrallaboratoriums für Mutagenitätsprüfung, Freiburg, stammende (C3H/HeHan x C57Bl/6JHan)F<sub>1</sub>-Mäuse im Alter von 3 - 6 Monaten benutzt. Diese zwei Inzuchtstämme wurden in beiden reziproken Kreuzungen gepaart. Eine zahlenmäßige Kontrolle der reziproken Kreuzungen fand nicht statt.

Der Verwandtschaftsgrad zweier Mäusestämme kann über die Allelverteilung erschlossen werden. Taylor (29) hat Daten über die Allele von 16 Genorten bei 27 Inzuchtstämmen mit einem Computerprogramm ausgewertet, das die Ähnlichkeit und damit die Verwandtschaft jedes Stammes mit jedem anderen ausrechnet. Die beiden Teststämme (C3H und C57Bl) unterscheiden sich in 9 der 16 Gene, sind daher im Vergleich zu anderen Stämmen sehr wenig miteinander verwandt.

Es gibt eine Nomenklatur von bisher gezüchteten Inzuchtstämmen, die auch kurz die Eigenschaften und genetische Ausstattung der Stämme angibt und die beiden Stämme (C3H und C57Bl) als in ihrem Ursprung unabhängige Zuchten aufführt (30).

### 2.2.2 Stimulation der Ovulation durch Hormone

Aus praktischen Gründen bevorzugt man heute fast in allen Laboratorien, mit Hormonen zu arbeiten. Denn einerseits will man genügend Eier zur Bearbeitung bekommen, andererseits aber sollten die Eier auch möglichst synchronisiert sein, damit man - im Falle der Substanzprüfung - die Wirkung der verwendeten Substanz zu dem Zeitpunkt, zu dem man das empfindlichste Stadium erwartet, an möglichst allen Eiern messen kann.

In dieser Arbeit wurden zwei Arten von Hormonen verwendet:

- Anteron (PMS = pregnant mare's serum) //SCHERING//

Anteron wird aus dem Serum trächtiger Stuten gewonnen und ist

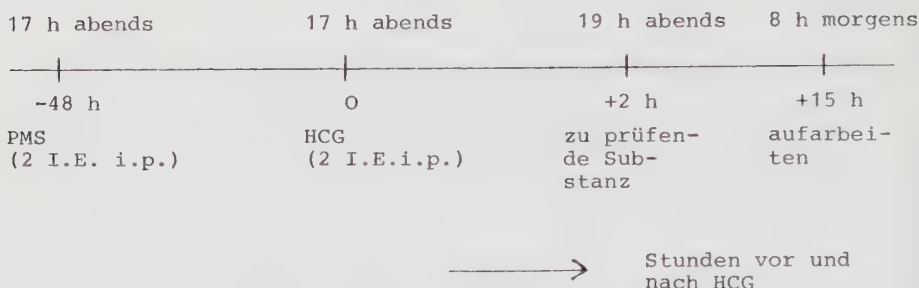
ein Gemisch von FSH- und LH-Aktivitäten (FSH = Follikel-stimulierendes Hormon; LH = luteinisierendes Hormon).

- Intergonan //VEMIE VETERINÄR CHEMIE GmbH//  
wirkt genauso wie Anteron.
- Primogonyl (HCG = human chorionic gonadotropine) //Schering//  
Primogonyl wird aus dem Harn schwangerer Frauen gewonnen und entspricht weitgehend dem luteinisierenden Hormon (LH). Primogonyl greift in die letzten Phasen der Follikelreifung ein, fördert den Sprung des Follikels und die Bildung von Östrogenen.

Für die Versuche dieser Arbeit wurden jeweils 3 bis 6 weibliche F<sub>1</sub>-Mäuse nach einem Zeitintervall von 48 Stunden zuerst mit PMS und danach mit HCG behandelt. Die PMS- und HCG-Dosis wird von den Autoren, die bisher damit gearbeitet haben, in verschiedenen Mengen angegeben. Vickers (31) hat 3 I.E. (Internationale Einheit) von jedem dieser Hormone, Tarkowski (32) 5 I.E. verwendet. In manchen Laboratorien werden bis zu 10 I.E. verwendet. Gates (33) hat bei Mäusen im Alter von 21, 25 und 29 Tagen mit verschiedenen PMS-Dosen Experimente durchgeführt und als optimale Dosis für PMS dabei 4 - 6 I.E. festgestellt. Um zu synchronisieren, aber zugleich Superovulation zu vermeiden, benutzt man gewöhnlich niedrigere Dosen von diesen Hormonen. In dieser Arbeit wurden pro Maus 2 I.E. von jedem Hormon nach folgendem Plan verwendet:

1. 2 I.E. PMS wurden pro Maus intraperitoneal gespritzt (PMS wurde vorher in 0,9 % NaCl-Lösung gelöst und in Eppendorf Reaktionsgefäßen im Eisschrank bei -10° aufbewahrt).
2. 48 Stunden nach PMS-Behandlung wurden 2 I.E. HCG i.p. gespritzt (HCG wurde genauso wie PMS angesetzt und aufbewahrt).
3. 15 Stunden nach HCG-Behandlung sind die Oozyten schon im MII-Stadium (MII-Oozyten) in der Ampulle des Eileiters. Dann kann man diese MII-Oozyten herausnehmen und für die Chromosomenpräparation bearbeiten.

Der tageszeitliche Plan war folgender:



### 2.2.3 Weitere Arbeitsschritte in den Versuchen an Embryonen

Auch Weibchen, von denen Embryonen gewonnen werden sollten, wurden mit PMS und HCG behandelt wie bereits für die MII-Oozytenversuche beschrieben. Statt die MII-Oozyten zu gewinnen, wurden die Weibchen 2 Stunden nach HCG-Behandlung mit Männchen des gleichen Stammes für eine Nacht zusammengesetzt. Damit möglichst viele Verpaarungen stattfinden konnten, wurden pro Versuch 3 Käfige mit jeweils 5 Weibchen und 5 Männchen angesetzt. Um unnötige Aggressionen zwischen den Männchen zu vermeiden, blieben die Männchen immer in denselben Fünfer-Gruppen zusammen. Da sich nach der Hormongabe alle Weibchen im Östrus befanden, war der Paarungserfolg nur noch von der Potenz und Deckbereitschaft der Männchen abhängig. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen von den Männchen getrennt und auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfes untersucht. Manchmal liegt der Vaginalpfropf tief in der Vagina und ist von außen nicht zu erkennen. Daher wurde ein mit Alkohol desinfiziertes Glasstäbchen verwendet, mit dem man in die Vagina hineingeht. Dieses Vorgehen hat sich gut bewährt. Wenn der Pfropf in der Vagina vorhanden ist, läßt sich das Stäbchen nicht einführen. Man kann so sicher kontrollieren, ob eine Maus begattet wurde oder nicht. Von den jeweils 15 Weibchen pro Versuch waren immer

8 - 12 begattet. Diese wurden bis zur Entnahme der Embryonen in einem gemeinsamen Käfig gehalten. Weibchen ohne Vaginalpfropf wurden nicht wieder verwendet.

Die verschiedenen Embryonalstadien vom Ein-Zellerbis zur Blastocyste wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Vaginalpfropfung untersucht gewonnen. Im Vergleich zu den MII-Oozyten taucht hier als zusätzliche Schwierigkeit auf, daß die Embryonalzellen künstlich in der Metaphase angehalten werden müssen. Dazu wurde Colchicin (Dosis: 2 mg/kg) benutzt.

Colchicin wird in dieser Arbeit zu zwei verschiedenen Zwecken benutzt:

1. als übliches Mittel, um Zellen in der Metaphase zu stoppen,
2. als Prüfsubstanz zur Induktion von ND.

Zur größeren Klarheit wird daher die Bezeichnung "Stop-Colchicin" bzw. "Test-Colchicin" gewählt, wenn der Verwendungszweck nicht bereits eindeutig aus dem Zusammenhang hervorgeht (chemisch gesehen ist "Stop-Colchicin" natürlich identisch mit "Test-Colchicin").

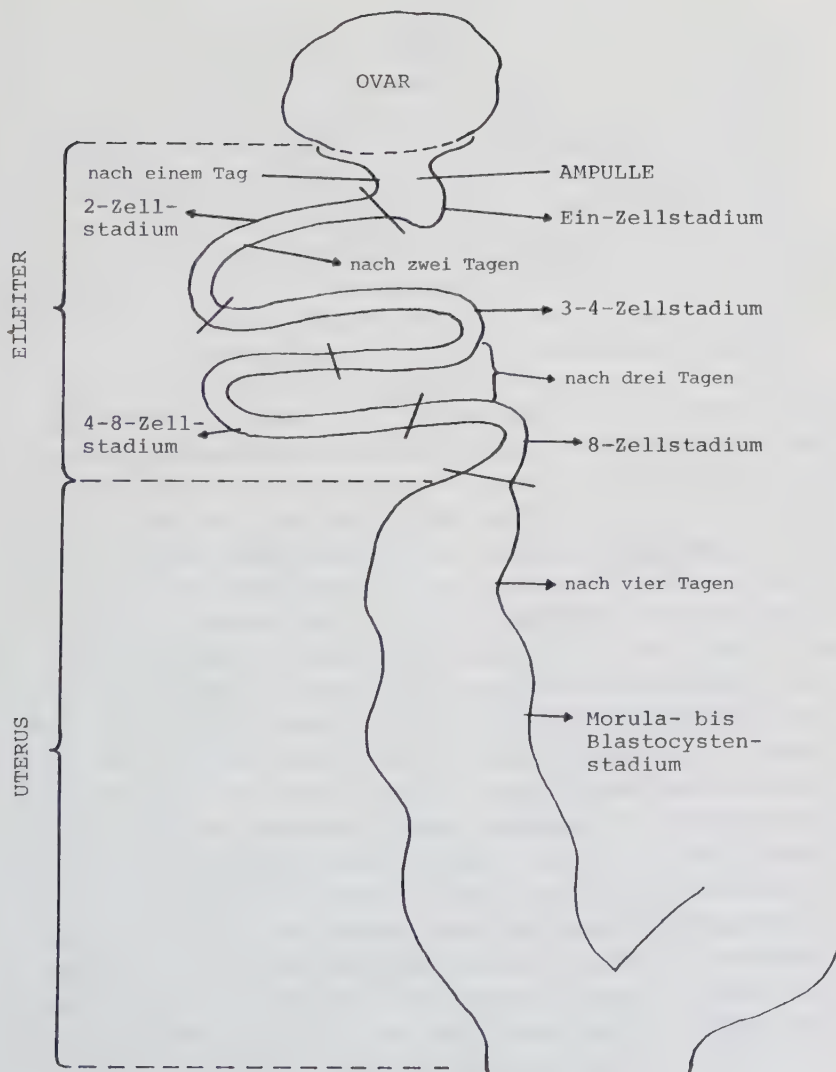
Die "Stop-Colchicin"-Behandlung dauerte 3 - 4 Stunden. Da die Ausbeute an Metaphasen in den Ein-Zellstadien mit dieser Behandlung aber sehr niedrig war (wegen der hohen Synchronität der ersten Furchungsteilung mußte genau der richtige Zeitpunkt getroffen werden, was sehr schwierig war und eine zusätzliche Arbeitsperiode nach Mitternacht erforderte), wurden die Ein-Zellstadien über Nacht, also ca. 15 Stunden lang, mit Colchicin gestoppt. So konnte eine Metaphasenausbeute von etwa 80 % erreicht werden. Für alle anderen Stadien erwies sich eine 3 - 4 stündige "Stop-Colchicin"-Behandlung als günstig.

Am Abend des zweiten Tages sind die Embryonen im 2-Zellstadium, am dritten Tag morgens im 4-Zellstadium, nachmittags im 8-16-Zellstadium, am 4. Tag im Blastocystenstadium und am 5. Tag morgens im Spät-Blastocystenstadium oder bereits implantiert. Dann lassen sie sich nicht mehr aus dem Uterus herausspülen.

Der Zeitplan für die Versuche an Embryonen war wie folgt:

| Tageszeit             | abends<br>5 Uhr | abends<br>5 Uhr | abends<br>7 Uhr                                  | morgens<br>8-9 Uhr                             |                 |                |                   |
|-----------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Versuchszeit          | -48 Std.        | 0 Std.          | +2 Std.                                          | Tag 1                                          | Tag 2           | Tag 3          | Tag 4             |
| Behandlung            | PMS             | HCG             | Testsubstanz u. Zusammen-<br>setzen<br>der Mäuse | Unter-<br>suchung<br>auf<br>Vaginal-<br>pfropf |                 |                |                   |
| Embryonalzu-<br>stand |                 |                 |                                                  | 1 Zelle                                        | 2 - 3<br>Zellen | 4-16<br>Zellen | Blasto-<br>cysten |

Das folgende Schema zeigt, wann und wo sich welche Entwicklungsstadien finden lassen:



## 2.2.4 Herausnahme der Geschlechtsorgane und Gewinnen der Eier und Embryonen

### 2.2.4.1 MII-Oozyten

15 Stunden nach HCG-Behandlung sind die MII-Oozyten schon in der Ampulle des Eileiters. Die Ampulle ist ein ausgestülpter Teil des Eileiters. Sie ist so durchsichtig, daß man die Oozyten unter dem Stereo-Mikroskop von außen sehen kann. Zu dieser Zeit wurde die Maus getötet und ein Bauchschnitt gemacht. Die Geschlechtsorgane (Ovar, Eileiter, Uterus) wurden herausgenommen und sofort in Hanks'-Lösung //SERVA// gegeben. Es können auch andere physiologische Lösungen verwendet werden (Ringer, isotonische NaCl-Lösung oder ähnliche Lösungen). Bei der Probe schien die Hanks'-Lösung die beste zu sein, in der die Eier 4 - 5 Stunden intakt blieben. Deswegen wurde bei dieser Arbeit meist Hanks'-Lösung verwendet. Dann wurde mit einer Schere der Uterus ganz in der Nähe des Eileiters abgeschnitten. Ovar und Eileiter wurden zusammen in ein frisches Schälchen mit Hanks'-Lösung gegeben. In der Lösung unter dem Stereo-Mikroskop wurden Ovar und Eileiter mit zwei Pinzetten ganz vorsichtig getrennt. Der Eileiter mit der Ampulle wurde wieder in ein frisches Schälchen mit Hanks'-Lösung gegeben. Mit einer Pinzette wurde die Ampulle eingeritzt. So kommen mit ein bißchen Druck die Eier umgeben von corona radiata-Zellen (= cumulus oophorus) heraus. In eine selbstgezogene und mundkontrollierte Pipette saugt man ein bißchen von einer Hyaluronidase-Lösung (1500 - 3000 I.E. Hyaluronidase aus Hammeltestes wurde in 10 ml Ringer-Lösung gelöst) und dann die von corona radiata-Zellen umgebenen Eier. So gibt man sie in ein Schälchen mit Hyaluronidase-Lösung. Die Hyaluronidase //SERVA// besitzt die Eigenschaft, glykosidische Bindungen der Hyaluronsäure und, in unterschiedlichem Grade, auch die einiger anderer saurer Mucopolysaccharide des Bindegewebes zu spalten. Das Enzym liegt hauptsächlich in einer inaktiven Form vor, trotzdem darf man annehmen, daß es regulierend in die Geschwindigkeit des Wasser- und Metabolitenaustausches eingreift, indem es die Viskosität der interzellulären Matrix herabsetzt (34). Es spielt eine physiologische Rolle bei der Befruchtung: Das Spermium enthält sehr viel

Hyaluronidase und kann so besser im Cervikalkanal vorangelangen und das Ei befruchten.

Die Eier blieben ca. 1 - 3 Minuten in der Hyaluronidase-Lösung. In dieser Zeit trennen sich die corona radiata-Zellen unter der Hyaluronidase-Wirkung von den Eiern. Nur intakte Eier sind von corona radiata-Zellen umgeben. Sind diese Zellen nicht vorhanden, zeigt das degenerative Veränderungen des Eies an, die zum Absterben des Eies führen. Trennen sich die corona radiata-Zellen so nicht, muß man mit der mundkontrollierten Pipette mehrmals ganz vorsichtig ein- und aussaugen. Dann werden die Eier mit der mundkontrollierten Pipette gesammelt und in ein anderes Schälchen mit Hanks'-Lösung gegeben. So sind die Eier sauber und präparationsbereit.

#### 2.2.4.2 Embryonen

Bei den Embryonen muß man die Zellen in der Metaphase mit Colchicin stoppen, was bei MII-Oozyten nicht nötig ist, da sie sowieso in der Metaphase sind. So wurden nach der 3 - 4 stündigen "Stop-Colchicin"-Behandlung in vivo (2 mg/kg Körpergewicht) die Mäuse getötet und die Geschlechtsorgane herausgenommen. Dann wurden die Embryonen entweder aus dem Eileiter oder aus dem Uterus ausgespült. Wenn die Embryonen im Eileiter sind (Ein-Zell- bis 8-Zell-Stadium), schneidet man den Eileiter ganz ab und gibt ihn in ein anderes Schälchen mit Hanks'-Lösung. Da der Eileiter zu dünn und geschlängelt ist und nach "Stop-Colchicin"-Behandlung leichter einreißt, war es sehr schwer, die Embryonen aus dem Eileiter auszuspülen. Es gelang nicht, wie von anderen Untersuchern beschrieben, Embryonen mit einer Mundpipette auszublasen. Die Eileiter wurden daher mit dünnspitzigen Pinzetten auseinandergerissen. Das alles wird unter einem Stereo-Mikroskop durchgeführt. Dann wurden die Embryonen mit der mundkontrollierten und selbstgezogenen Pipette gesammelt und in ein anderes Schälchen mit Hanks'-Lösung gegeben. Durch das Auseinanderreißen mit Pinzetten werden vielleicht einige wenige Embryonen zerstört.

Das Ausspülen der Embryonen gelang jedoch, wenn sie im Uterus waren (8-Zellstadium bis Blastocysten). Man kann dann mit einer mundkontrollierten Pipette arbeiten. Saugt man in die mundkontrollierte Pipette etwas Flüssigkeit ein und geht mit der spitzen Seite der Pipette in den Uterus hinein, so können alle Embryonen durch die Flüssigkeit ausgespült werden. Die Embryonen werden gesammelt und in eine frische Hanks'-Lösung gegeben.

Die folgenden Fotos zeigen exemplarisch derartig gewonnene Lebendpräparate von MII-Oozyten und Embryonen verschiedener Stadien (in 0,9 %iger NaCl-Lösung unter einem Umkehrmikroskop photographiert).

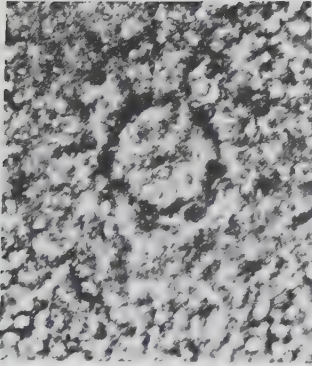


Abb. 3

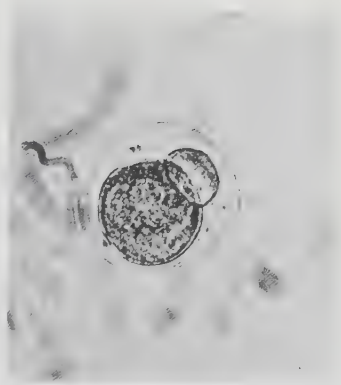


Abb. 4

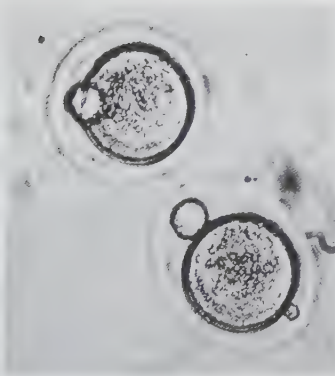


Abb. 5



Abb. 6

Abb. 3: Eine MII-Oozyte umgeben von corona radiata-Zellen

Abb. 4: Eine MII-Oozyte mit einem großen Polkörper ohne corona radiata-Zellen

Abb. 5: Zwei MII-Oozyten mit kleinen Polkörpern ohne corona radiata-Zellen

Abb. 6: Ein-Zellstadium

Vergrößerung: ca. 300fach

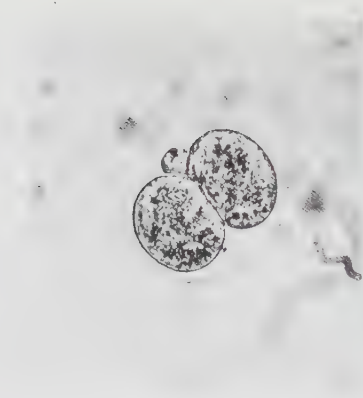


Abb. 7



Abb. 8

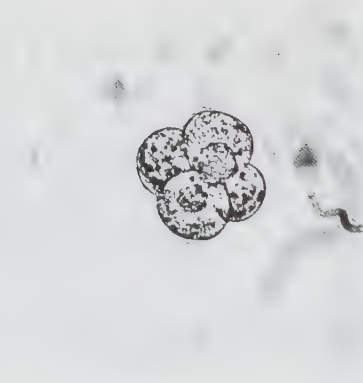


Abb. 9

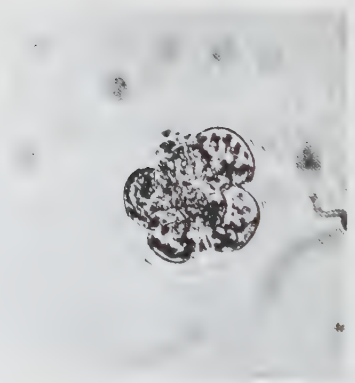


Abb. 10

Abb. 7: 2-Zellstadium

Abb. 8: 3-Zellstadium

Abb. 9: 4-Zellstadium

Abb. 10: 6-Zellstadium

Vergrößerung: ca. 300fach

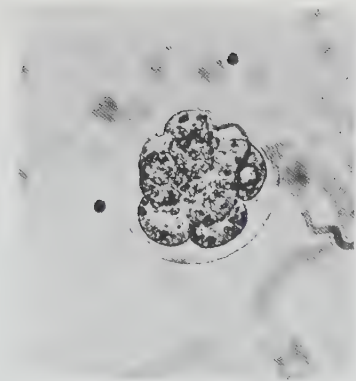


Abb. 11

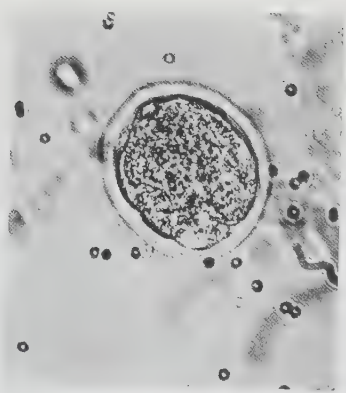


Abb. 12

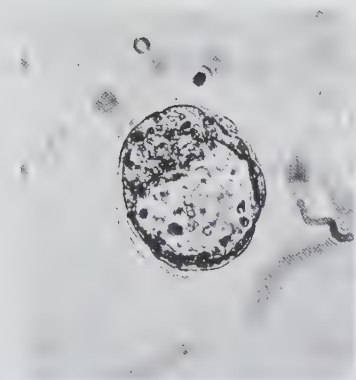


Abb. 13

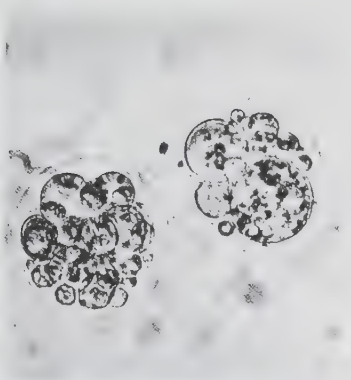


Abb. 14

Abb. 11: Ein Embryo im 8 - 16-Zellstadium

Abb. 12: Ein Embryo im Morulastadium

Abb. 13: Ein Embryo im Blastocystenstadium

Abb. 14: Zwei degenerierte Eier im MII-Oozytenstadium

Vergrößerung: ca. 300fach

## 2.2.5 Präparation der Eier bzw. Embryonen durch Luft-trocknen

### 2.2.5.1 Hypotone Behandlung

Nachdem die Eier in einem Schälchen mit Hanks'-Lösung gesammelt wurden, wurden sie mit hypotoner Lösung behandelt. Als hypotone Lösung wurde 0,8 bis 1 %ige  $\text{Na}_3\text{Citrat}$ -Lösung verwendet. Man kann auch geringere Konzentrationen und andere hypotone Lösungen verwenden (KCl-Lösungen, destilliertes Wasser, usw.). Es wurde etwas von der hypotonen Lösung in die mundkontrollierte Pipette und dann einige Eier (3 bis 6 Eier) aus dem Schälchen aufgesogen. Beim Einsaugen muß man vorsichtig sein, nicht zuviel Hanks'-Lösung mit den Eiern aus dem Schälchen in die hypotone Lösung gelangen zu lassen. Die Eier schwellen durch die hypotone Lösung an, platzen jedoch erst später beim Fixieren. So wurden die Eier in hypotoner Lösung auf einem Objektträger mit Vertiefung für 9 - 16 Minuten bei Zimmertemperatur stengelassen. Man kann inzwischen unter dem Stereo-Mikroskop kontrollieren, ob die Eier genügend angeschwollen sind. Für MII-Oozyten und Embryonen bis zum 8-Zellstadium reicht eine hypotone Behandlung von 9 - 16 Minuten. Für Blastocysten braucht man eine längere Behandlung.

### 2.2.5.2 Fixierung

Anschließend werden die Eier bzw. Embryonen fixiert. Das weitaus beste Fixierungsmittel ist konzentrierte Essigsäure und absoluter Äthylalkohol oder Methylalkohol im Verhältnis 1 : 3 Teilen. Das Fixativ muß jedes Mal vor der Arbeit frisch angesetzt werden. Beim Arbeiten steht das Fixativ in einer Flasche in Trockeneis (es muß kalt sein) daneben. Nachdem das Ei in hypotoner Lösung genügend angeschwollen ist, wird es mit der vorher benutzten mundkontrollierten Pipette aufgesogen und auf einen trockenen, fettfreien Objektträger gegeben, der vorher über Nacht in Alkohol und etwas 1nHCl oder in Brennspiritus und etwas 1nHCl oder am besten in Haemo-Sol und dann in Alkohol gestellt und dann gründlich mit heißem Wasser gespült wurde. Es darf nicht zuviel Flüssigkeit auf dem Objektträger sein. Ist das Ei auf dem Ob-

jektträger, so muß man sofort zur Fixierung übergehen. Man nimmt eine andere mundkontrollierte Pipette und saugt etwas Fixativ ein. Die Spitze der Pipette wird genau über das Ei gebracht und zuerst nur ein Tropfen auf das Ei gegeben. Nach dem ersten Tropfen schwimmt das Ei vielleicht etwas, setzt sich aber bald auf dem Objektträger fest. Zwei Tropfen reichen meistens, die Eier zum Platzen zu bringen. Nach jedem Tropfen sollte man etwas warten und beobachten, ob das Ei bereits platzt und dann den nächsten Tropfen. Zuviel Fixativ ist nicht empfehlenswert. Die Chromosomen werden entweder geschädigt oder sind nicht gut anfärbbar. Durch das Platzen werden die Kerne der Zellen weit auseinander gesprengt. Auch Cytoplasma wird gut gespreitet. Schließlich platzen auch die Kerne beim Lufttrocknen, so breiten sich die Chromosomen aus. In dieser Phase der Behandlung kann man die Chromosomen unter einem normalen Lichtmikroskop beobachten, wenn die Zelle in der Metaphase ist und das Cytoplasma auf dem Objektträger nur noch eine dünne Schicht bildet (MII-Oozyten bis 8-Zellstadium). Bei Blastocysten ist dies schwer zu beobachten.

Nachdem das Ei geplatzt ist, numeriert man den Objektträger und läßt ihn an der Luft trocknen (mindestens eine Stunde, besser über Nacht). So wurden pro Versuch 30 bis 60 MII-Oozyten präpariert und anschließend gefärbt.

#### 2.2.6 Färbung

Für Präparate, bei denen Zellen und Chromosomen fest am Objektträger haften, stehen mehrere Färbungsverfahren zur Verfügung. Bei dieser Arbeit wurde die Giemsa-Färbung bevorzugt.

Die luftgetrockneten Präparate wurden 9 - 12 Minuten in gepufferte Giemsa-Lösung gestellt. Dann wurden sie in Aqua bidest. durchgespült, trocknen gelassen, auf den Objektträger etwas Klebemittel gegeben und mit einem Deckglas zugedeckt.

Herstellung der Giemsa-Lösung:

7 ml Giemsa-Stammlösung //MERCK//

10 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Puffer A: 45,36 g ad 1 Liter Aqua bidest.)

10 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Puffer B: 59,33 g ad 1 Liter Aqua bidest.)

73 ml Aqua bidest.

zusammenfiltrieren.

Die Giemsa-Lösung färbt zwar das Cytoplasma auch etwas, ist aber das einfachste und praktischste Verfahren. Die Chromosomen werden stark angefärbt.

### 2.2.7 Auswertung und Photographie der Präparate

Die Präparate wurden unter das Lichtmikroskop gebracht, die Metaphasen aufgesucht und die Chromosomen jeder auswertbaren Metaphase gezählt. Nach mindestens dreimaligem Durchzählen der Metaphase-Chromosomen wurde festgestellt, ob sich numerische Abweichungen fanden. Der Aufgabenstellung entsprechend wurde nur die numerische Untersuchung der Metaphase-Chromosomen durchgeführt. Die Metaphasen mit abweichender Chromosomenzahl wurden bestimmt und einige davon mit einem Photomikroskop zur Dokumentation photographiert. Die Filme werden dann entwickelt und abgezogen.

## 2.3 Prüfsubstanzen und ihre Applikation

Stadiumsensitivität:

Wenn man Chromosomenaberrationen in Mäuseeiern erfassen will, um an deren Zahl die Mutagenität einer Substanz zu prüfen, so ist es wichtig, zu wissen, zu welchem Zeitpunkt die zu prüfende Substanz gegeben werden soll. Da die Chromosomenanalyse in dieser Arbeit meist im MII-Stadium gemacht werden sollte, sollten nur die Stadien der Meiose, die vor der Metaphase II liegen, in Frage kommen.

Edwards und Searle (35) haben weibliche Mäuse mit PMS (1,5 I.E.) und 40 Stunden später mit HCG (2 I.E.) behandelt. Zu ver-

schiedenen Zeiten vor und nach HCG-Behandlung wurden die Weibchen mit Röntgenstrahlen (Dosis: 100r bzw. 200r) bestrahlt. Danach wurden die Weibchen mit männlichen Mäusen gepaart. Am 13.Tag wurden die trächtigen Mäuse getötet und die Anzahl von corpora lutea, lebender und toter Foeten ausgezählt. So wurde die Radiosensitivität der verschiedenen Stadien der Meiose untersucht und festgestellt, daß die Bestrahlung 5 Stunden nach HCG-Behandlung das empfindlichste Stadium trifft (etwa MI-Stadium). Ihm folgen Anaphase I und Metaphase II.

Zu demselben Ergebnis kommt auch Röhrborn (25), der die weiblichen Mäuse im MI-Stadium mit alkylierenden Substanzen Trenimon und Cytosan behandelte.

Alle theoretischen und experimentellen Arbeiten weisen darauf hin, daß das MI-Stadium das empfindlichste Stadium zur Induktion von Non-Disjunction ist. Deswegen wurde in dieser Arbeit die jeweilige Substanz, deren mutagene Wirkung geprüft werden sollte, 2 Stunden (in einer Versuchsreihe 3 Stunden) nach HCG-Behandlung appliziert (kurz vor der Metaphase I).

#### Toxizitätsversuche:

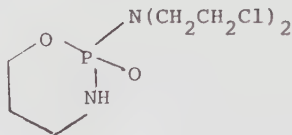
Es wurden vorher Toxizitätsversuche durchgeführt, so daß für jede Substanz eine möglichst hohe aber für die Maus noch verträgliche Dosis festgestellt wurde, die bei den einzelnen Prüfsubstanzen (s.u.) genannt ist. Die Dosis für Cyclophosphamid und ortho-Phenylendiamin wurde aus der Literatur entnommen. Da die Maus optimal 1 ml Substanzlösung vertragen kann und einige Substanzen sich auch in Alkalilaugen nur schwer lösten, konnten von diesen Substanzen nur die jeweils in 1 ml löslichen Mengen gespritzt werden. Jedes Mal wurde die Substanzlösung frisch angesetzt, die weiblichen Mäuse auf einer Waage gewogen und je nach Körpergewicht dosiert.

In den Versuchen mit Embryonen wurde nur eine Substanz geprüft, "Test-Colchicin". Es wurde ebenfalls kurz vor dem MI-Stadium, also 2 Stunden nach HCG-Gabe, in einer Dosis von 0,3 mg/kg verabreicht.

Liste der geprüften Substanzen:

1. Cyclophosphamid (34)

// Asta-Werke, Bielefeld //



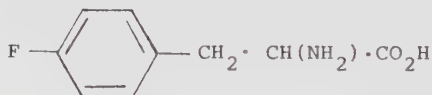
Löslich: in Wasser

Verwendete Dosis: 145 mg/kg Körpergewicht

Angewandt in der Medizin: Als Cytostaticum bei malignen Tumoren

2. p-Fluor-Phenylalanin (36)

// SIGMA, München //



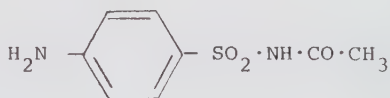
Löslich: in Alkalilaugen

Verwendete Dosis: 300 mg/kg und 500 mg/kg Körpergewicht

Anwendungsbereich: ausschließlich in der Wissenschaft

3. Sulfacetamid (36)

// SIGMA, München //



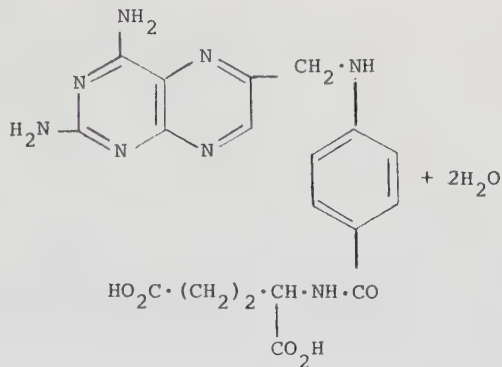
Löslich: in Alkalilaugen

Verwendete Dosis: 900 mg/kg Körpergewicht

Angewandt in der Medizin: bei Cystitis, Pyelitis, Meningitis, Magen-Darminfektionen und gewissen infektiösen Hautkrankheiten

4. Aminopterin (4-Amino-pteroyl-glutaminsäure) (36)

// SIGMA, München //



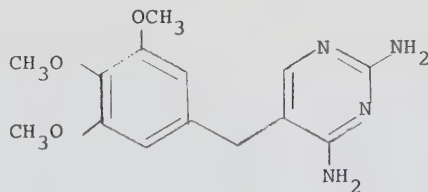
Löslich: in Alkalilaugen

Verwendete Dosis: 100 mg/kg und 200 mg/kg Körpergewicht

Angewandt in der Medizin: bei subakuten und akuten lymphatischen Leukämien im Kindesalter

5. Trimethoprim (34)

// SIGMA, München //



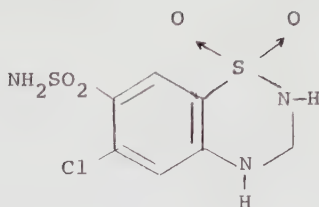
Gespritzt: in 3 % gummi arabicum als Suspension

Verwendete Dosis: 1000 mg/kg Körpergewicht

Angewandt in der Medizin: antibakteriell

6. Esidrix (Hydrochlorothiazid)

// CIBA //



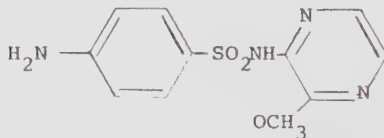
Gespritzt: in 3 % gummi arabicum als Suspension

Verwendete Dosis: 600 mg/kg Körpergewicht

Angewandt in der Medizin: als harnausscheidendes und blutdrucksenkendes Mittel.

7. Kelfizin (Sulfamethoxypyrazin)

// VETEM S.p.A., Milano, Italien //



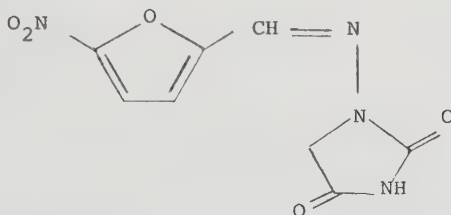
Lösung: Injektionslösung 30 % verdünnt mit Wasser

Verwendete Dosis: 1000 mg/kg Körpergewicht

Angewandt in der Medizin: Kelfizin wirkt bakteriostatisch auf gram-negative Erreger sowie auf zahlreiche gram-negative Keime. Besonders erfolgreich ist es bei akuten Infektionen und bei guter Abwehrlage des erkrankten Tieres.

8. Nitrofurantoin (N-nitro-furfurylidene-aminohydantoin)

// CIBA //



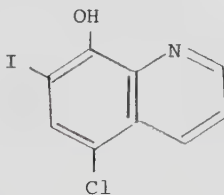
Gespritzt: in 3 % gummi arabicum als Suspension

Verwendete Dosis: 100 mg/kg und 200 mg/kg Körpergewicht

Angewandt in der Medizin: Besitzt bakterienschädigende Eigenschaften und wird deshalb bei Harnweg-Infektionen gebraucht

9. Entero-Vioform (Iodochlorhydroxyquinoline)

// CIBA //



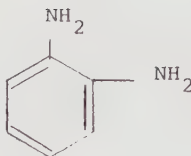
Gespritzt: in 3 % gummi arabicum als Suspension

Verwendete Dosis: 300 mg/kg Körpergewicht

Angewandt in der Medizin: Zur Behandlung von Durchfallerkrankungen

10. Ortho-Phenylendiamin (36)

//FLUKA AG, Buchs, Schweiz //



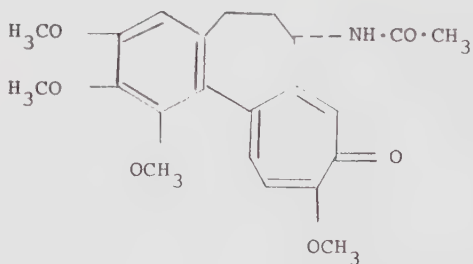
Löslich: in Wasser

Verwendete Dosis: 216 mg/kg Körpergewicht

Angewandt in der Technik: für Feinkornentwickler in der Photographie und in der organischen Synthese

11. Colchicin (36)

// ROTH, Karlsruhe //



Gespritzt: in 0,9 % Salzlösung

Verwendete Dosis: 0,3 mg/kg Körpergewicht

Angewandt in der Medizin: bei akuter Gicht

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Ergebnisse mit MII-Oozyten

Da es verschiedene Inzuchtstämme von Mäusen gibt und die Behandlung von Testsubstanzen bei jedem Stamm zu unterschiedlichen Ergebnissen führen könnte, bestand am Anfang die Frage, welcher Mäusestamm für diese Arbeit verwendet werden sollte. Es war aus der Literatur (13) bekannt, daß die Substanz Cyclophosphamid bei Mäusen Non-disjunction auslöst. Es standen im Institut größere Individuenzahlen von zwei Mäusestämmen zur Verfügung, und zwar C3H Inzucht-Mäuse und (C3H/HeHan x C57Bl/6JHan) $F_1$ -Mäuse. Als erster Versuch sollten mit beiden Mäusestämmen vergleichende Kontrollversuche und Testversuche mit Cyclophosphamid durchgeführt werden, um festzustellen, wie unterschiedlich die beiden Stämme sind. Erst dann sollte entschieden werden, welcher Stamm für die weiteren Versuche benutzt werden sollte.

##### 3.1.1 Kontrollversuche mit $F_1$ -Mäusen (vgl. Tabelle 2)

Es wurde zunächst die Häufigkeit von spontan entstandener ND (Kontrollversuche) an  $F_1$ -Mäusen bestimmt. Wie im Abschnitt Methodik beschrieben, wurden insgesamt 142  $F_1$ -Mäuseweibchen bearbeitet und 1402 MII-Oozyten gewonnen. Die gewonnene Eizahl pro Maus variierte zwischen 3 und 15. Von diesen 1402 MII-Oozyten waren 651 auswertbar. Von den 651 auswertbaren Oozyten waren 29 mit 19 Chromosomen und 622 mit  $n = 20$  Chromosomen. Es wurde keine MII-Oozyte mit 21 Chromosomen gefunden. Unter den präparierten Oozyten waren 30 degeneriert und 3 im MI-Stadium.

##### 3.1.2 Testversuche mit $F_1$ -Mäusen unter Verwendung von CYCLOPHOSPHAMID (vgl. Tabelle 3)

Das Verfahren war genauso wie bei Kontrollversuchen. Nur: 3 Stunden nach HCG-Behandlung wurde die Testsubstanz Cyclophosphamid (Dosis: 145 mg/kg) i.p. gespritzt. Von 146 bearbeiteten Mäusen wurden insgesamt 1438 Eier gewonnen und präpariert. Davon waren 627 auswertbar, darunter 18 Eier mit 19 Chromosomen, 607 Eier

mit  $n = 20$  Chromosomen, ein Ei mit 21 Chromosomen und ein Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid. Unter den präparierten Oozyten waren 8 Oozyten degeneriert und eine Oozyte im MI-Stadium. Die gewonnene Eizahl pro Maus war durchschnittlich 9,8 (1438/146).

Abbildung 15 zeigt ein Ei mit  $n = 20$  Chromosomen, Abbildung 16 das Ei mit 21 Chromosomen, Abbildung 17 das Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid, Abbildung 18 ein Ei mit 19 Chromosomen und Abbildung 19 einen Ausschnitt aus einer nicht auswertbaren Metaphase mit mehreren geschädigten Chromosomen.

Tab. 2

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus unbehandelten F1-Mäusen

| Versuchs-<br>Nr. | Mäusezahl | Eizahl | davon aus-<br>wertbare | Chromosomenzahl |    |    | BESONDERHEITEN           |
|------------------|-----------|--------|------------------------|-----------------|----|----|--------------------------|
|                  |           |        |                        | 19              | 20 | 21 |                          |
| 1                | 2         | 15     | 3                      | -               | 3  | -  | -                        |
| 2                | 2         | 25     | 7                      | -               | 7  | -  | -                        |
| 3                | 2         | 14     | 4                      | -               | 4  | -  | -                        |
| 4                | 2         | 16     | 6                      | 1               | 5  | -  | -                        |
| 5                | 3         | 29     | 9                      | 1               | 8  | -  | -                        |
| 6                | 3         | 28     | 10                     | -               | 10 | -  | -                        |
| 7                | 3         | 32     | 7                      | 1               | 6  | -  | -                        |
| 8                | 5         | 52     | 25                     | 4               | 21 | -  | 6 degenerierte Eier      |
| 9                | 3         | 29     | 10                     | -               | 10 | -  | -                        |
| 10               | 3         | 35     | 11                     | 1               | 10 | -  | -                        |
| 11               | 3         | 33     | 12                     | 1               | 11 | -  | -                        |
| 12               | 3         | 21     | 9                      | -               | 9  | -  | -                        |
| 13               | 5         | 55     | 22                     | 1               | 21 | -  | 2 degenerierte Eier      |
| 14               | 4         | 45     | 18                     | 1               | 17 | -  | 1 deg. Ei<br>1 MI-Oocyte |
| 15               | 5         | 60     | 20                     | 1               | 19 | -  | 7 deg. Eier              |
| 16               | 3         | 29     | 12                     | 2               | 10 | -  | -                        |
| 17               | 4         | 42     | 14                     | -               | 14 | -  | 2 deg. Eier              |
| 18               | 5         | 28     | 11                     | 1               | 10 | -  | -                        |
| 19               | 4         | 30     | 17                     | -               | 17 | -  | 2 deg. Eier              |

FORTSETZUNG DER TABELLE 2

| Versuchs-<br>Nr.    | Mäusezahl | Eizahl | davon aus-<br>wertbare | Chromosomenzahl |     |    | BESONDERHEITEN                               |
|---------------------|-----------|--------|------------------------|-----------------|-----|----|----------------------------------------------|
|                     |           |        |                        | 19              | 20  | 21 |                                              |
| 20                  | 5         | 30     | 16                     | -               | 16  | -  | -                                            |
| 21                  | 5         | 30     | 13                     | -               | 13  | -  | 1 deg. Ei                                    |
| 22                  | 4         | 27     | 12                     | -               | 12  | -  | 2 deg. Eier<br>1 MI-Oozyte                   |
| 23                  | 5         | 41     | 26                     | 2               | 24  | -  | -                                            |
| 24                  | 5         | 51     | 28                     | -               | 28  | -  | -                                            |
| 25                  | 5         | 56     | 28                     | 1               | 27  | -  | 1 deg. Ei                                    |
| 26                  | 5         | 50     | 26                     | 1               | 25  | -  | -                                            |
| 27                  | 5         | 50     | 24                     | -               | 24  | -  | -                                            |
| 28                  | 5         | 57     | 31                     | 1               | 30  | -  | 2 deg. Eier                                  |
| 29                  | 5         | 56     | 32                     | -               | 32  | -  | 1 deg. Ei                                    |
| 30                  | 5         | 59     | 33                     | 3               | 30  | -  | -                                            |
| 31                  | 5         | 59     | 35                     | 4               | 31  | -  | -                                            |
| 32                  | 5         | 64     | 35                     | 2               | 33  | -  | -                                            |
| 33                  | 5         | 59     | 29                     | -               | 29  | -  | 3 deg. Eier<br>1 MI-Oozyte                   |
| 34                  | 5         | 52     | 29                     | -               | 29  | -  | -                                            |
| 35                  | 4         | 43     | 27                     | -               | 27  | -  | -                                            |
| F A L<br>O O<br>F E |           |        |                        |                 |     |    | 30 degenerierte Eier<br>3 Eier in MI-Stadium |
|                     | 142       | 1402   | 651                    | 29              | 622 | -  |                                              |
|                     |           |        |                        |                 |     |    |                                              |

Tab. 3

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus CYCLOPHOSPHAMID-behandelten F1-Mäusen (Dosis: 145mg/kg)

| Versuchs-<br>Nr. | Mäusezahl | Eizahl | davon aus-<br>wertbare | Chromosomenzahl |    |    | BESONDERHEITEN      |
|------------------|-----------|--------|------------------------|-----------------|----|----|---------------------|
|                  |           |        |                        | 19              | 20 | 21 |                     |
| 36               | 4         | 37     | 8                      | -               | 8  | -  | 1 gap               |
| 37               | 5         | 51     | 21                     | -               | 21 | -  | -                   |
| 38               | 5         | 55     | 29                     | 2               | 27 | -  | -                   |
| 39               | 5         | 55     | 21                     | 1               | 20 | -  | 2 degenerierte Eier |
| 40               | 4         | 44     | 13                     | -               | 13 | -  | -                   |
| 41               | 5         | 34     | 11                     | -               | 11 | -  | 1 deg. Ei           |
| 42               | 3         | 35     | 12                     | -               | 12 | -  | -                   |
| 43               | 4         | 34     | 12                     | -               | 12 | -  | 1 deg. Ei           |
| 44               | 5         | 56     | 33                     | -               | 33 | -  | -                   |
| 45               | 4         | 41     | 29                     | -               | 29 | -  | 1 MI-Oozyte         |
| 46               | 4         | 38     | 11                     | -               | 11 | -  | -                   |
| 47               | 6         | 70     | 36                     | 5               | 31 | -  | -                   |
| 48               | 5         | 44     | 26                     | -               | 26 | -  | -                   |
| 49               | 5         | 49     | 23                     | -               | 23 | -  | -                   |
| 50               | 4         | 39     | 17                     | -               | 17 | -  | -                   |
| 51               | 3         | 42     | 12                     | 2               | 10 | -  | 1 deg. Ei           |
| 52               | 4         | 37     | 20                     | -               | 20 | -  | 1 deg. Ei           |
| 53               | 4         | 41     | 20                     | -               | 20 | -  | 1 deg. Ei           |
| 54               | 2         | 23     | 9                      | 1               | 8  | -  | -                   |

FORTSETZUNG DER TABELLE 3

| Versuchs-<br>Nr.      | Mäusezahl | Eizahl | davon aus-<br>wertbare | Chromosomenzahl |     |      | BESONDERHEITEN                                                                                    |
|-----------------------|-----------|--------|------------------------|-----------------|-----|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                       |           |        |                        | 19              | 20  | 21   |                                                                                                   |
| 55                    | 3         | 27     | 14                     | -               | 14  | -    | -                                                                                                 |
| 56                    | 3         | 38     | 4                      | -               | 4   | -    | -                                                                                                 |
| 57                    | 4         | 37     | 10                     | -               | 10  | -    | -                                                                                                 |
| 58                    | 4         | 42     | 23                     | -               | 23  | -    | -                                                                                                 |
| 59                    | 4         | 33     | 18                     | 1               | 17  | -    | -                                                                                                 |
| 60                    | 3         | 39     | 17                     | 1               | 16  | -    | -                                                                                                 |
| 61                    | 5         | 42     | 17                     | -               | 17  | -    | -                                                                                                 |
| 62                    | 4         | 35     | 17                     | -               | 17  | -    | -                                                                                                 |
| 63                    | 5         | 43     | 15                     | 1               | 14  | -    | -                                                                                                 |
| 64                    | 5         | 53     | 26                     | 2               | 24  | -    | -                                                                                                 |
| 65                    | 5         | 47     | 26                     | -               | 26  | -    | -                                                                                                 |
| 66                    | 5         | 42     | 15                     | -               | 15  | -    | -                                                                                                 |
| 67                    | 5         | 44     | 20                     | 1               | 18  | 1*   | *1Ei mit 20 Chromosomen<br>+ 1 Chromatid                                                          |
| 68                    | 5         | 38     | 15                     | 1               | 14  | -    | 1 deg. Ei                                                                                         |
| 69                    | 5         | 53     | 27                     | -               | 26  | 1    | -                                                                                                 |
| T<br>O<br>T<br>A<br>L |           |        |                        |                 |     |      | 1 gap<br>8 degenerierte Eier<br>1 Ei im MI-Stadium<br>1* Ei mit 20 Chro-<br>mosomen + 1 Chromatid |
|                       | 146       | 1438   | 627                    | 18              | 607 | 1+1* |                                                                                                   |
|                       |           |        |                        |                 |     |      |                                                                                                   |
|                       |           |        |                        |                 |     |      |                                                                                                   |

Abb. 15

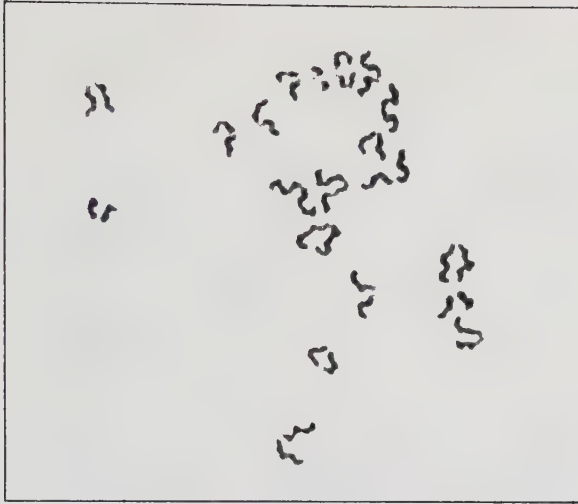


Abb. 16

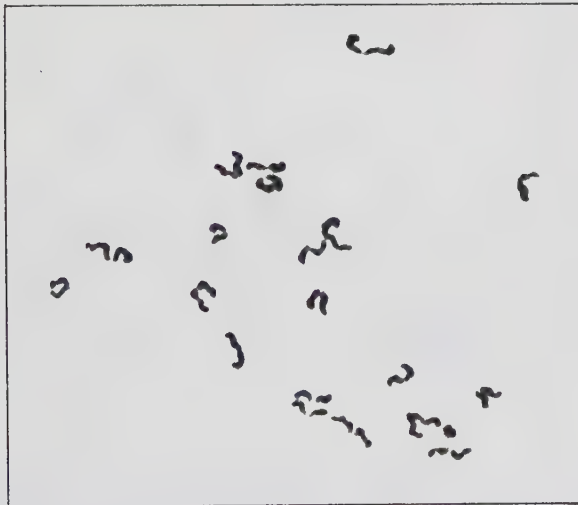


Abb. 15: Eine normale MII-Oocyte mit 20 Chromosomen, gewonnen von einer CYCLOPHOSPHAMID-behandelten F1-Maus.  
Versuch Nr.: 49/ Präparat Nr.: 2/ hypotone Behandl.: 11'  
Vergr.: ca. 900fach

Abb. 16: Eine MII-Oocyte mit 21 Chromosomen, gewonnen von einer CYCLOPHOSPHAMID-behandelten F1-Maus.  
Versuch Nr.: 69/ Präparat Nr.: 7/ hypotone Behandl.: 11'  
Vergr.: ca. 800fach

Abb. 17

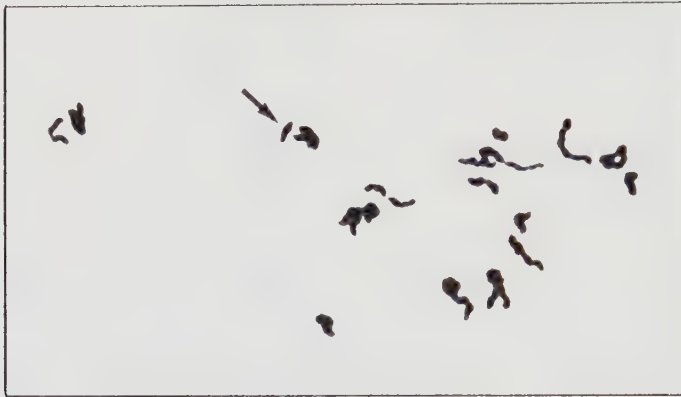


Abb. 18



Abb. 17: Eine MII-Oozyte mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid, gewonnen von einer CYCLOPHOSPHAMID-behandelten F1-Maus.  
Versuch Nr. 67/ Präparat Nr.65/ hypotone Behandl. 13'  
Vergr.: ca. 800fach

Abb. 18: Eine MII-Oozyte mit 19 Chromosomen, gewonnen von einer CYCLOPHOSPHAMID-behandelten F1-Maus.  
Versuch Nr. 47/ Präparat Nr. 9/ hypotone Behandl. 14'  
Vergr.: ca. 500fach

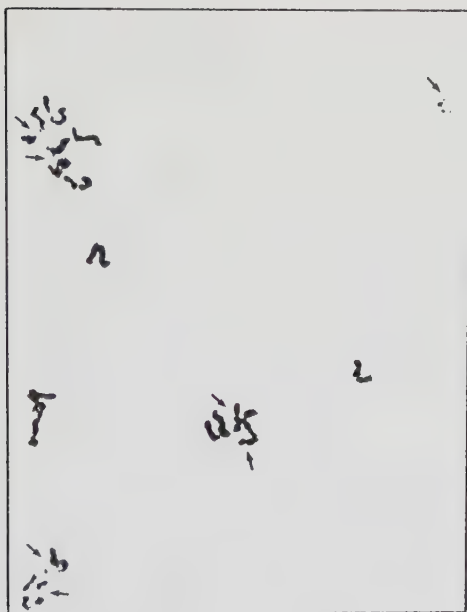


Abb. 19: Ausschnitt aus einer nicht auswertbaren Metaphase mit mehreren anscheinend geschädigten Chromosomen, gewonnen von einer CYCLOPHOSPHAMID-behandelten F1-Maus.  
Die Pfeile deuten auf einige der geschädigten Chromosomen.  
Versuch Nr. 36/ Präparat Nr. 31/ hypotone Beh.: 9'  
Vergr.: ca. 450fach

### 3.1.3 Kontrollversuche mit C3H-Mäusen (vgl. Tabelle 4)

Ohne Substanzbehandlung wurden insgesamt 79 Mäuse bearbeitet und 739 Eier gewonnen. Davon waren 535 Eier auswertbar. Von diesen auswertbaren Eiern waren 10 Eier mit 19 Chromosomen, 519 Eier mit  $n = 20$  Chromosomen, 4 Eier mit 21 Chromosomen, ein Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid und ein Ei mit 40 Chromosomen (der erste Polkörper ist nicht abgetrennt). Auffallend war auch, daß mehrere Chromosomen in Chromatiden gespalten waren. Die gewonnene Eizahl pro Maus war durchschnittlich 9,2 (739/79). Abbildung 20 zeigt eine Oozyte mit 21 Chromosomen, Abbildung 21 die Oozyte mit 40 Chromosomen und Abbildung 22 eine nicht auswertbare Metaphase mit in Chromatiden gespaltenen Chromosomen.

### 3.1.4 Testversuche mit C3H-Mäusen unter Verwendung von CYCLOPHOSPHAMID (vgl. Tabelle 5)

3 Stunden nach HCG-Behandlung wurde die Testsubstanz Cyclophosphamid (Dosis: 145 mg/kg) i.p. gespritzt. Von den 115 bearbeiteten Mäusen wurden insgesamt 949 Eier gewonnen. Davon waren 537 Eier auswertbar. Unter diesen auswertbaren Eiern waren 10 Eier mit 19 Chromosomen, 518 Eier mit  $n = 20$  Chromosomen, 4 Eier mit 21 Chromosomen, 2 Eier mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid, ein Ei mit 22 Chromosomen und ein Ei mit 40 Chromosomen. Besonderheiten waren: 5 mal ein Chromosom in Chromatiden gespalten, ein degeneriertes Ei und ein Ei mit 19 Chromosomen + 1 Stück. Die gewonnene Eizahl pro Maus war durchschnittlich 8,2 (949/115). Abbildung 23 zeigt ein Ei mit 21 Chromosomen und Abb. 24 das Ei mit 22 Chromosomen.

Tab. 4

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus unbehandelten C3H-Mäusen

| Versuchs-Nr. | Mäusezahl | Eizahl | davon auswertbare | Chromosomenzahl |     |       | BESONDERHEITEN                                 |
|--------------|-----------|--------|-------------------|-----------------|-----|-------|------------------------------------------------|
|              |           |        |                   | 19              | 20  | 21    |                                                |
| 70           | 5         | 45     | 30                | 3               | 27  | -     | 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten         |
| 71           | 5         | 56     | 32                | 2               | 30  | -     | Einige Chromosomen in 2 Chromatiden gespalten  |
| 72           | 5         | 27     | 21                | -               | 21  | -     | -                                              |
| 73           | 5         | 60     | 38                | -               | 38  | -     | -                                              |
| 74           | 5         | 50     | 32                | -               | 32  | -     | -                                              |
| 75           | 5         | 48     | 31                | -               | 31  | -     | 2x ein Chromosom in 2 Chromatiden gespalten    |
| 76           | 5         | 57     | 38                | 1               | 37  | -     | 2x ein Chromosom in 2 Chromatiden gespalten    |
| 77           | 5         | 40     | 33                | -               | 33  | -     | -                                              |
| 78           | 4         | 34     | 18                | 1               | 17  | -     | -                                              |
| 79           | 5         | 43     | 33                | -               | 31  | 1+1** | **1 Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid        |
| 80           | 5         | 51     | 37                | -               | 35  | 2     | 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten         |
| 81           | 5         | 49     | 35                | 1               | 32  | 1     | 1 Ei mit 40 Chromosomen                        |
| 82           | 5         | 45     | 43                | 1               | 42  | -     | -                                              |
| 83           | 5         | 44     | 40                | -               | 40  | -     | 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten         |
| 84           | 4         | 30     | 22                | -               | 22  | -     | 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten         |
| 85           | 6         | 60     | 52                | 1               | 51  | -     | -                                              |
| TOTAL        |           |        |                   |                 |     |       | mehrere Chromosomen in 2 Chromatiden gespalten |
|              | 79        | 739    | 535               | 10              | 519 | 4+1** | 1 Ei mit 40 Chromosomen                        |
|              |           |        |                   |                 |     |       | **1 Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid        |

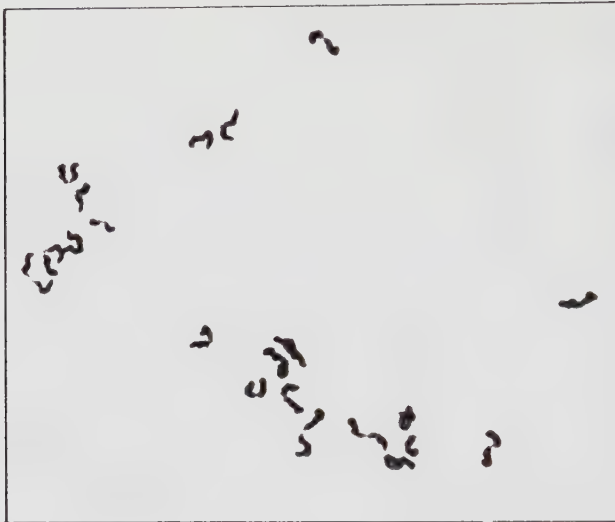


Abb. 20: Eine hyperhaploide MII-Oozyte mit 21 Chromosomen.  
Gewonnen von einem UNBEHANDELTEN C3H-Mäuseweib-  
chen.  
Versuch Nr.79/ Präparat Nr. 43/ hypotone  
Behandlung: 15'  
Vergr.: ca. 700fach

a)



b)

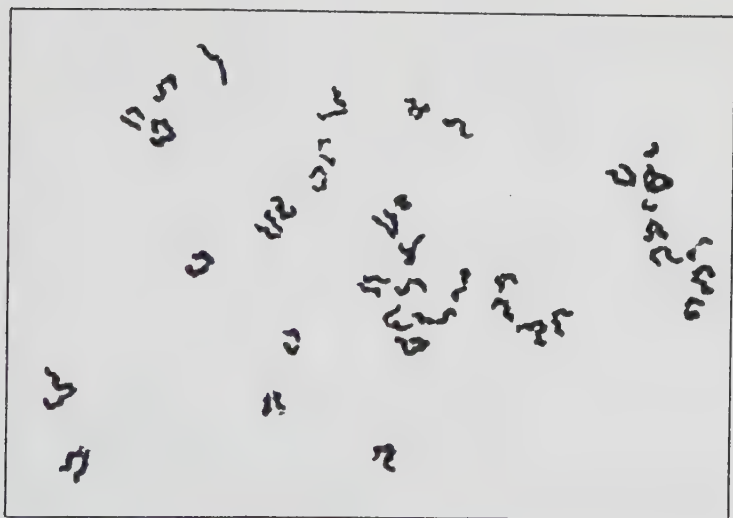


Abb. 21: Eine MII-Oozyte mit 40 Chromosomen, gewonnen von einer UNBEHANDELTEN C3H-Inzuchtm Maus. Der erste Polkörper ist offenbar nicht abgeschnürt.

a) Übersicht. Vergr.: ca. 250fach

b) Vergrößert. (ca. 700fach)

Versuch Nr. 81/ Präparat Nr. 48/ hypotone  
Behandlung: 14 Min.

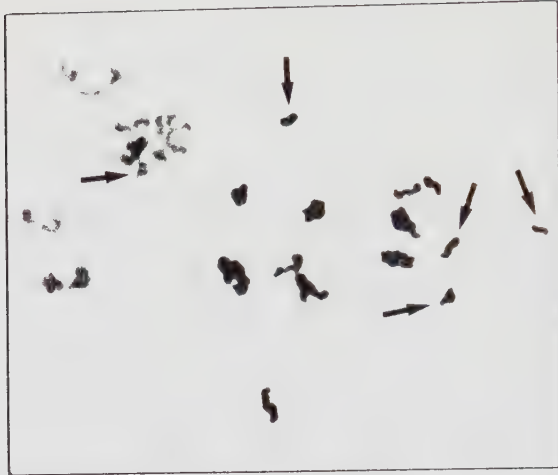


Abb. 22: Eine nicht auswertbare Metaphase II, in der mehrere Chromosomen in Chromatiden gespalten sind (Pfeile).  
Gewonnen von einem UNBEHANDELTEN Mäuseweibchen des Stammes C3H.

Versuch Nr. 71/ Präparat Nr. 18/ hypotone  
Behandlung: 9 Min.  
Vergr.: ca. 700fach

Tab. 5

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus CYCLOPHOSPHAMID-behandelten C3H-Mäusen (Dosis: 145mg/kg)

| Versuchs-Nr. | Mäusezahl | Eizahl | davon auswertbare | Chromosomenzahl |       |       | BESONDERHEITEN                          |
|--------------|-----------|--------|-------------------|-----------------|-------|-------|-----------------------------------------|
|              |           |        |                   | 19              | 20    | 21    |                                         |
| 86           | 5         | 39     | 13                | 1               | 12    | -     | -                                       |
| 87           | 5         | 30     | 9                 | -               | 9     | -     | 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten  |
| 88           | 5         | 28     | 6                 | -               | 6     | -     | -                                       |
| 89           | 3         | 26     | 8                 | -               | 8     | -     | -                                       |
| 90           | 5         | 37     | 16                | -               | 16    | -     | -                                       |
| 91           | 4         | 30     | 16                | -               | 16    | -     | -                                       |
| 92           | 5         | 26     | 9                 | -               | 9     | -     | 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten  |
| 93           | 4         | 30     | 20                | -               | 19+1* | -     | 1* Ei mit 19 Chromosomen + 1 Stück      |
| 94           | 2         | 11     | 7                 | -               | 7     | -     | -                                       |
| 95           | 3         | 15     | 11                | -               | 11    | -     | -                                       |
| 96           | 5         | 44     | 26                | -               | 26    | -     | -                                       |
| 97           | 4         | 34     | 19                | 1               | 18    | -     | -                                       |
| 98           | 4         | 28     | 21                | 1               | 20    | -     | -                                       |
| 99           | 3         | 30     | 16                | -               | 16    | -     | -                                       |
| 100          | 5         | 39     | 22                | -               | 21    | 1     | -                                       |
| 101          | 5         | 49     | 25                | -               | 25    | -     | 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten  |
| 102          | 5         | 45     | 20                | 1               | 19    | -     | -                                       |
| 103          | 5         | 44     | 24                | -               | 24    | -     | -                                       |
| 104          | 3         | 45     | 30                | -               | 28    | 1+1** | **1 Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid |

FORTSETZUNG DER TABELLE 5

| Versuchs-<br>Nr. | Mausezahl | Eizahl | davon aus-<br>wertbare | Chromosomenzahl |                             |                                               | BESONDERHEITEN                                        |
|------------------|-----------|--------|------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
|                  |           |        |                        | 19              | 20                          | 21                                            |                                                       |
| 105              | 5         | 47     | 26                     | -               | 26                          | -                                             | -                                                     |
| 106              | 5         | 42     | 25                     | -               | 24                          | -                                             | 1 Ei mit 40 Chromosomen                               |
| 107              | 5         | 41     | 27                     | 1               | 25                          | 1                                             | 1 deg. Ei                                             |
| 108              | 5         | 58     | 44                     | 1               | 43                          | -                                             | 2x ein Chromosom in 2 Chromatiden gespalten           |
| 109              | 3         | 25     | 20                     | -               | 20                          | -                                             | -                                                     |
| 110              | 5         | 29     | 22                     | -               | 22                          | -                                             | -                                                     |
| 111              | 4         | 38     | 25                     | 2               | 22                          | 1 <sup>&amp;&amp;</sup>                       | &&1Ei mit 22 Chromosomen                              |
| 112              | 3         | 39     | 30                     | 2               | 26                          | 1+1 <sup>**</sup>                             | <sup>**</sup> 1 Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid   |
| TOTAL            |           |        |                        |                 |                             |                                               | 5x 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten             |
|                  |           |        |                        |                 |                             |                                               | 1 deg. Ei                                             |
|                  | 115       | 949    | 537                    | 10              | 518<br>+ 1 <sup>&amp;</sup> | 4+1 <sup>&amp;&amp;</sup><br>+2 <sup>**</sup> | 1 <sup>&amp;</sup> Ei mit 19 Chromosomen + 1 Stück    |
|                  |           |        |                        |                 |                             |                                               | 1Ei mit 40 Chromosomen                                |
|                  |           |        |                        |                 |                             |                                               | &&1Ei mit 22 Chromosomen                              |
|                  |           |        |                        |                 |                             |                                               | <sup>**</sup> 2 Eier mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid |

a)



b)

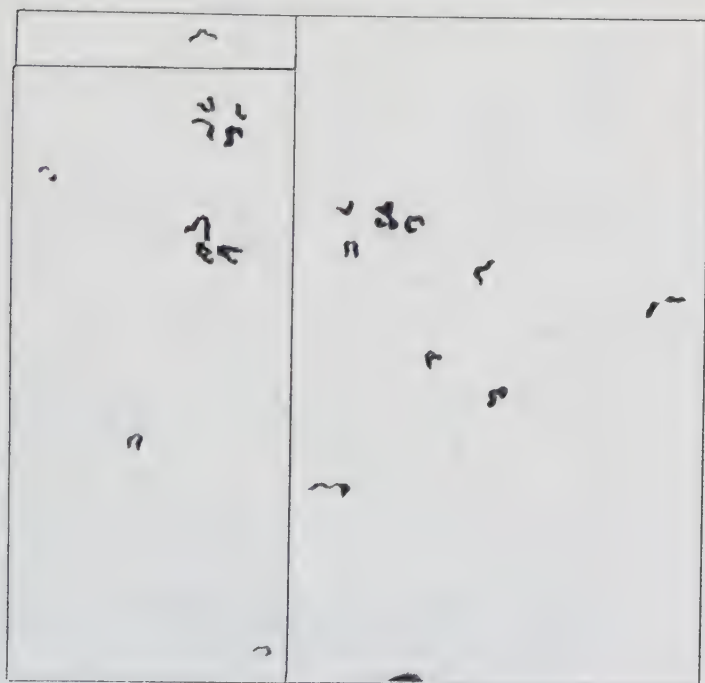
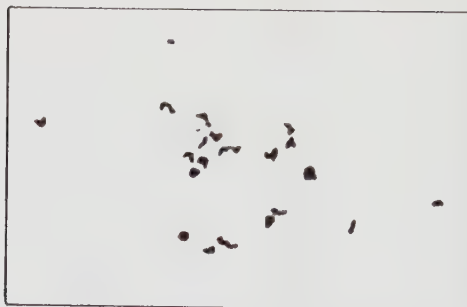


Abb. 23: Eine MII-Oozyte mit 21 Chromosomen, gewonnen von einer CYCLOPHOSPHAMID-behandelten C3H-Maus.  
a) Übersicht. Vergr.: ca. 250fach  
b) Vergrößert. (ca. 600fach)  
Versuch Nr. 100/ Präparat Nr. 13/ hypot. Behandl.: 11'

a)



b)

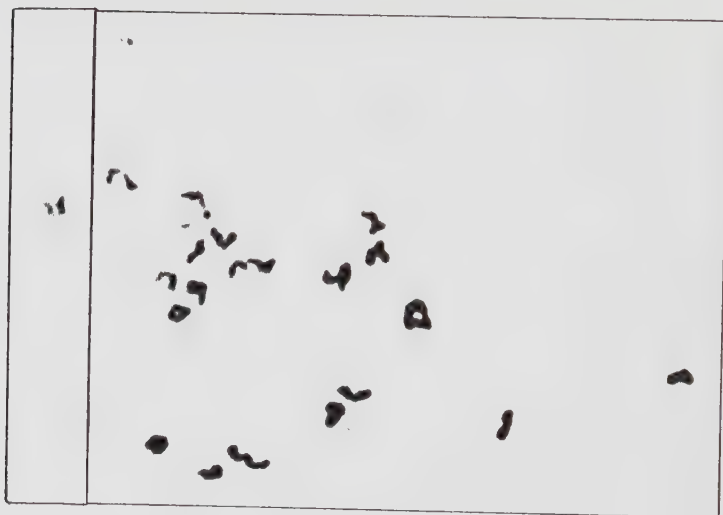


Abb. 24: Eine MII-Oozyte mit 22 Chromosomen.  
Gewonnen von einem CYCLOPHOSPHAMID-behandelten  
Mäuseweibchen des Stammes C3H.

a) Übersicht. Vergr.: ca. 300fach

b) Vergrößert. (ca. 650fach)

Versuch Nr. 111/ Präparat Nr. 26/ hypotone  
Behandlung: 9 Min.

Faßt man die Daten von Tabelle 2 bis 5 zusammen:

| Mäusestamm              | Cyclophosphamid | Auswertbare<br>Eier | d a v o n     |                                                                         |
|-------------------------|-----------------|---------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------|
|                         |                 |                     | Hyperhaploide | Eier mit $\pm$ Stück<br>oder Chromatid,<br>bzw. mit 40 Chromo-<br>somen |
| F <sub>1</sub> -Hybride | 0               | 651                 | 0             | 0                                                                       |
|                         | 145 mg/kg       | 627                 | 1             | 1                                                                       |
| C3H                     | 0               | 535                 | 4             | 2                                                                       |
|                         | 145 mg/kg       | 537                 | 5             | 4                                                                       |

so wird deutlich, daß die Inzuchttiere des C3H-Stammes mit und ohne Cyclophosphamid mehr chromosomale Abweichungen aufweisen als die Hybridtiere.

Da die statistische Absicherung mutagener Effekte bei F<sub>1</sub>-Tieren leichter möglich erscheint und da die vielfache Heterozygotie der Hybriden auch der heterozygoten menschlichen Bevölkerung näher kommt als ein Inzuchtstamm, wurden für alle weiteren Versuche ausschließlich (C3H x C57Bl)F<sub>1</sub>-Hybride benutzt.

Auf die vorkommenden Besonderheiten (degenerierte Eier, in Chromatiden gespaltene Chromosomen, Eier im MI-Stadium und Eier mit 20 Chromosomen + Fragment usw.) in diesen Versuchen und in den folgenden weiteren Versuchen und ebenso auf die Frage, ob Cyclophosphamid tatsächlich Non-disjunction erzeugt, wird in der Diskussion eingegangen.

### 3.1.5 Ergebnisse mit p-FLUOR-PHENYLALANIN (vgl. Tabelle 6)

F<sub>1</sub>-Mäuse wurden 2 Stunden nach HCG-Behandlung mit p-Fluor-Phenylalanin (p-FPA) behandelt (Dosis: 300 mg/kg). Es wurden 53 Mäuseweibchen bearbeitet und insgesamt 534 Eier gewonnen, pro Maus durchschnittlich 10,1 (534/53). Davon waren 313 Eier auswertbar, darunter 10 Eier mit 19 Chromosomen, 302 Eier mit  $n = 20$  Chromosomen und ein Ei mit 40 Chromosomen. Abbildung 25 zeigt das Ei mit  $2 \times 20$  Chromosomen.

In einer zweiten Versuchsserie wurde die Dosis auf 500 mg/kg gesteigert. Insgesamt wurden 61 Mäuse bearbeitet und 584 Eier gewonnen. Durchschnittliche Eizahl pro Maus war 9,6 (584/61). Von den gewonnenen Eiern waren 403 auswertbar (siehe Tab. 6). Von diesen waren 3 Eier mit 19 Chromosomen, 399 mit  $n = 20$  Chromosomen und ein Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid. Als Besonderheit waren 4 Eier degeneriert. Abbildung 26 zeigt das Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid.

In beiden Versuchsserien wurde keine Oozyte mit hyperhaploidem Chromosomensatz gefunden.

### 3.1.6 Ergebnisse mit SULFACETAMID (vgl. Tabelle 7)

Ebenso wurden mit Sulfacetamid-Behandlung 75 F<sub>1</sub>-Mäuse bearbeitet und 815 Eier gewonnen (d.h. im Mittel 10,8 pro Weibchen). Von diesen waren 574 auswertbar. Unter den auswertbaren waren 5 mit 19 Chromosomen, 566 mit  $n = 20$  Chromosomen, 2 mit 21 Chromosomen und ein Ei mit 40 Chromosomen. Von den gewonnenen Eiern waren 2 degeneriert und ein Ei vor dem MII-Stadium. Abbildung 27 zeigt ein Ei mit 21 Chromosomen und Abbildung 28 das Ei vor dem MII-Stadium.

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus p-FLUOR-PHENYLALANIN behandelten Fl-Mäusen (Dosis: 300 und 500mg/kg)

|                | Versuchs-Nr. | Mäusezahl | Eizahl | davon auswertbare | Chromosomenzahl |     |    | BESONDERHEITEN                                                                                  |
|----------------|--------------|-----------|--------|-------------------|-----------------|-----|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                |              |           |        |                   | 19              | 20  | 21 |                                                                                                 |
| DOSIS 300mg/kg | 113          | 5         | 44     | 25                | 1               | 24  | -  | 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten                                                          |
|                | 114          | 3         | 40     | 23                | 1               | 22  | -  | -                                                                                               |
|                | 115          | 4         | 46     | 23                | 1               | 22  | -  | -                                                                                               |
|                | 116          | 5         | 57     | 34                | 3               | 31  | -  | -                                                                                               |
|                | 117          | 5         | 48     | 23                | -               | 23  | -  | 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten                                                          |
|                | 118          | 5         | 45     | 28                | -               | 28  | -  | 2x 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten                                                       |
|                | 119          | 5         | 37     | 19                | -               | 19  | -  | -                                                                                               |
|                | 120          | 5         | 58     | 37                | -               | 36  | -  | 1 Ei mit 40 Chromosomen                                                                         |
|                | 121          | 5         | 44     | 27                | -               | 27  | -  | -                                                                                               |
|                | 122          | 5         | 60     | 35                | 1               | 34  | -  | -                                                                                               |
|                | 123          | 6         | 55     | 39                | 3               | 36  | -  | -                                                                                               |
|                | Total        |           |        |                   |                 |     |    | 4x 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten<br>1 Ei mit 40 Chromosomen                            |
| DOSIS 500mg/kg |              | 53        | 534    | 313               | 10              | 302 | -  |                                                                                                 |
|                | 124          | 6         | 66     | 41                | 1               | 40  | -  | -                                                                                               |
|                | 125          | 5         | 43     | 27                | 1               | 26  | -  | -                                                                                               |
|                | 126          | 5         | 58     | 36                | -               | 36  | -  | 1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten                                                          |
|                | 127          | 5         | 42     | 28                | -               | 28  | -  | -                                                                                               |
|                | 128          | 5         | 52     | 32                | -               | 32  | -  | -                                                                                               |
|                | 129          | 5         | 54     | 37                | -               | 37  | -  | 1 deg. Ei                                                                                       |
|                | 130          | 4         | 31     | 23                | 1               | 22  | -  | -                                                                                               |
|                | 131          | 6         | 48     | 35                | -               | 35  | -  | -                                                                                               |
|                | 132          | 5         | 44     | 32                | -               | 32  | -  | 2 deg. Eier                                                                                     |
|                | 133          | 5         | 45     | 31                | -               | 31  | -  | 1 deg. Ei                                                                                       |
|                | 134          | 5         | 42     | 34                | -               | 33  | 1* | *1 Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid                                                          |
|                | 135          | 5         | 59     | 47                | -               | 47  | -  | -                                                                                               |
|                | Total        |           |        |                   |                 |     |    | 4 deg. Eier<br>1 Chromosom in 2 Chromatiden gespalten<br>*1 Ei mit 20 Chromosomen + 1 Chromatid |
|                |              | 61        | 584    | 403               | 3               | 399 | 1* |                                                                                                 |

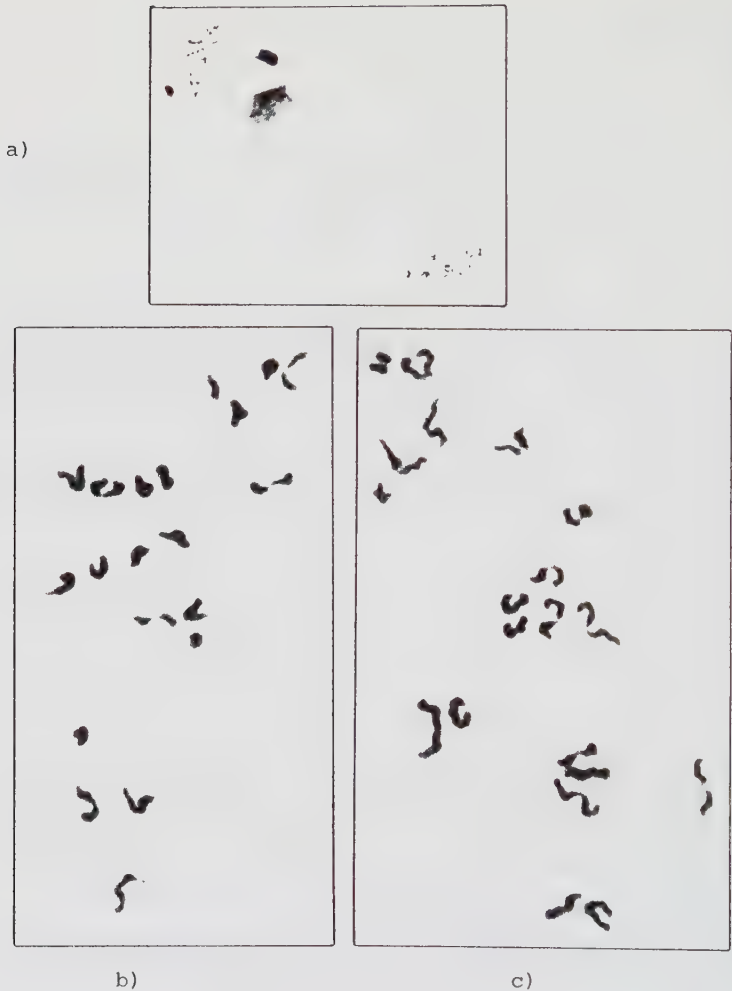


Abb. 25: Eine MII-Oozyte mit 2x20 Chromosomen (der erste Polkörper ist nicht abgeschnürt).  
Gewonnen von einer p-FLUOR-PHENYLALANIN-behandelten F1-Maus (Dosis: 300mg/kg).

- a) Übersicht. Vergr.: ca. 80fach
- b) Die eine Hälfte vergrößert. 1x20 Chromosomen.
- c) Die andere Hälfte, 1x20 Chromosomen.

Versuch Nr. 120/ Präparat Nr. 37/ hypot. Behandl.: 9'  
Vergrößerung von b) und c): ca. 700fach

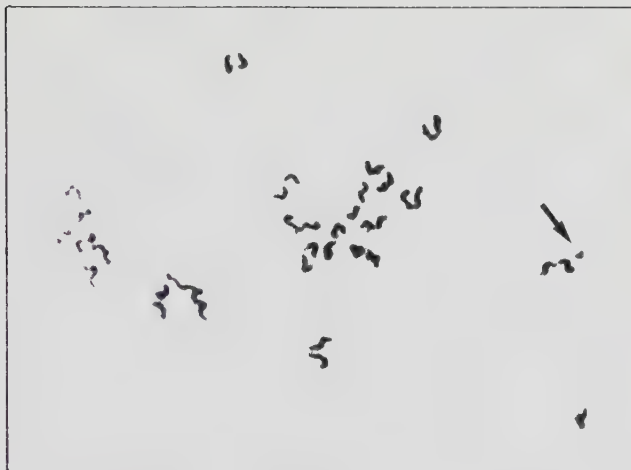


Abb. 26: Eine MII-Oozyte mit 20 Chromosomen und einem Chromatid.  
Gewonnen von einer p-FLUOR-PHENYLALANIN-behandelten F1-Hybridmaus.  
(Dosis: 500 mg/kg)

Der Pfeil deutet auf das überzählige Chromatid.

Versuch Nr. 134/ Präparat Nr. 8/ hypotone Behandlung: 16 Min.  
Vergr.: ca. 600fach

Tab. 7

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus SULFACETAMID-behandelten Fl-Mäusen (Dosis: 900mg/kg)

| Versuchs-<br>Nr.           | Mäusezahl | Eizahl | davon aus-<br>wertbare | Chromosomenzahl |     |    | BESONDERHEITEN                                                                       |
|----------------------------|-----------|--------|------------------------|-----------------|-----|----|--------------------------------------------------------------------------------------|
|                            |           |        |                        | 19              | 20  | 21 |                                                                                      |
| 136                        | 4         | 51     | 36                     | -               | 35  | -  | 1 Ei mit 40 Chromosomen                                                              |
| 137                        | 5         | 49     | 37                     | 1               | 35  | 1  | -                                                                                    |
| 138                        | 6         | 59     | 43                     | -               | 43  | -  | -                                                                                    |
| 139                        | 5         | 55     | 39                     | -               | 38  | 1  | -                                                                                    |
| 140                        | 4         | 30     | 24                     | -               | 24  | -  | -                                                                                    |
| 141                        | 4         | 48     | 32                     | 1               | 31  | -  | -                                                                                    |
| 142                        | 6         | 71     | 43                     | -               | 43  | -  | -                                                                                    |
| 143                        | 6         | 70     | 44                     | -               | 44  | -  | -                                                                                    |
| 144                        | 7         | 85     | 57                     | -               | 57  | -  | -                                                                                    |
| 145                        | 4         | 45     | 36                     | -               | 36  | -  | -                                                                                    |
| 146                        | 4         | 44     | 32                     | -               | 32  | -  | 1 deg. Ei                                                                            |
| 147                        | 4         | 43     | 29                     | 1               | 28  | -  | -                                                                                    |
| 148                        | 5         | 48     | 37                     | -               | 37  | -  | 1 deg. Ei                                                                            |
| 149                        | 5         | 57     | 40                     | 2               | 38  | -  | -                                                                                    |
| 150                        | 6         | 60     | 45                     | -               | 45  | -  | 1 Oozyte vor MII-Stad.                                                               |
| E<br>O<br>O<br>F<br>A<br>L |           |        |                        |                 |     |    | 1 Ei mit 40 Chromoso-<br>men<br>2 degenerierte Eier<br>1 Oozyte vor MII-Sta-<br>dium |
|                            | 75        | 815    | 574                    | 5               | 566 | 2  |                                                                                      |
|                            |           |        |                        |                 |     |    |                                                                                      |
|                            |           |        |                        |                 |     |    |                                                                                      |

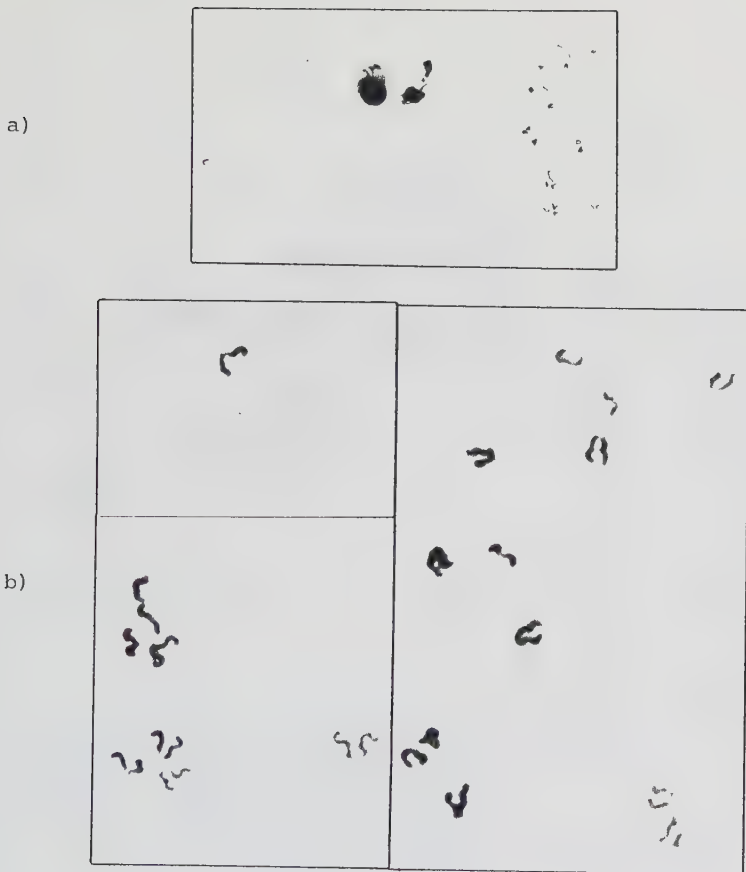


Abb. 27: Eine MII-Oozyte mit 21 Chromosomen.  
Gewonnen von einem SULFACETAMID-behandelten  
F1-Weibchen.

a) Übersicht. Vergr.: ca. 150fach

b) Dieselbe Metaphase vergrößert. (ca. 650fach)

Versuch Nr. 137/ Präparat Nr. 10/ hypotone  
Behandlung: 16 Min.

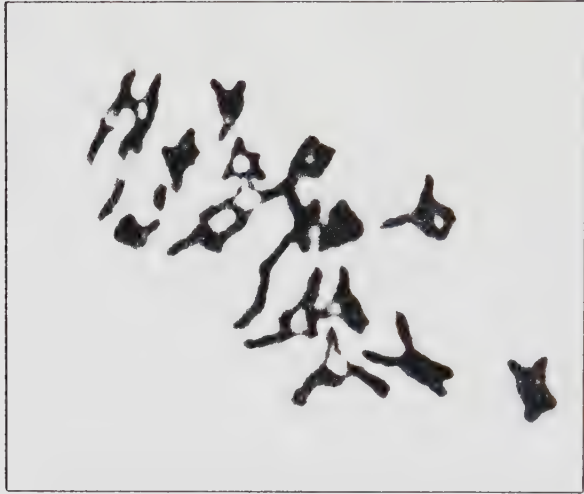


Abb. 28: Eine Oozyte, die das MII-Stadium noch nicht erreicht hat (die Chiasmata sind noch nicht gelöst).  
Gewonnen von einer SULFACETAMID-behandelten F1-Maus.

Versuch Nr. 150/ Präparat Nr. 7/  
hypotone Behandlung: 17 Min.  
Vergr.: ca. 850fach

### 3.1.7 Ergebnisse mit AMINOPTERIN (vgl. Tabelle 8)

Als Dosis wurde zuerst 100 mg/kg verwendet. Mit dieser Dosis wurden 15 Mäuse bearbeitet und 155 Eier gewonnen, d.h. im Mittel 10,3 pro Weibchen. Davon waren 109 auswertbar, darunter ein Ei mit 19 Chromosomen und 108 mit  $n = 20$  Chromosomen. Von den gewonnenen Eiern waren 2 Oozyten im MI-Stadium. Auffallend waren mehrere Metaphasen, bei denen mehrere Chromosomen in 2 Chromatiden gespalten waren. Metaphasen mit 21 Chromosomen wurden nicht gefunden.

In einer zweiten Versuchsserie wurde die Dosis auf 200 mg/kg gesteigert. Es wurden 75 Mäuse bearbeitet und 769 Eier gewonnen, also 10,2 pro Weibchen. Davon waren 2 Eier degeneriert und ein Ei im MI-Stadium. 573 Eier waren auswertbar. Davon waren 5 Eier mit 19 Chromosomen, 567 mit  $n = 20$  Chromosomen und ein Ei mit 20 Chromosomen + Fragment (siehe Tabelle 8). Abbildung 29 zeigt dieses Ei mit 20 Chromosomen + Fragment.

### 3.1.8 Ergebnisse mit TRIMETHOPRIM (vgl. Tabelle 9)

Mit Trimethoprim-Behandlung (Dosis: 1000mg/kg) wurden insgesamt 73 Mäuse bearbeitet und 675 Eier gewonnen. Die durchschnittliche Eizahl pro Weibchen war 9,2 (675/73). Von 561 auswertbaren Oozyten waren 9 hypohaploid (19 Chromosomen), 551 mit  $n = 20$  Chromosomen und ein Ei mit 20 Chromosomen + Fragment. Einmal waren 2 Chromosomen in Chromatiden gespalten.

| Ergebnisse der Analyse von MI-E-Oozyten aus AMINOPTERIN-behandelten Fl-Mäusen (Dosis: 100 und 200mg/kg) |           |        |                   |                 |     |    |                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|-------------------|-----------------|-----|----|---------------------------------------------------|
| Versuchs-Nr.                                                                                            | Mäusezahl | Eizahl | davon auswertbare | Chromosomenzahl |     |    | BESONDERHEITEN                                    |
|                                                                                                         |           |        |                   | 19              | 20  | 21 |                                                   |
| DOSIS 100mg/Kg                                                                                          |           |        |                   |                 |     |    |                                                   |
| 151                                                                                                     | 4         | 34     | 30                | -               | 30  | -  | 1 Oozyte in MI                                    |
| 152                                                                                                     | 5         | 53     | 35                | 1               | 34  | -  | 1 Oozyte in MI                                    |
| 153                                                                                                     | 6         | 68     | 44                | -               | 44  | -  | 2xmehrere Chromosomen in 2 Chromatiden gespal     |
| TOTAL                                                                                                   |           |        |                   |                 |     |    | 2 Oozyten im MI-Stadium                           |
|                                                                                                         | 15        | 155    | 109               | 1               | 108 | -  | 2x mehrere Chromosomen in 2 Chromatiden gespalten |
|                                                                                                         |           |        |                   |                 |     |    |                                                   |
|                                                                                                         |           |        |                   |                 |     |    |                                                   |
| DOSIS 200mg/Kg                                                                                          |           |        |                   |                 |     |    |                                                   |
| 154                                                                                                     | 5         | 55     | 36                | -               | 36  | -  | -                                                 |
| 155                                                                                                     | 5         | 52     | 41                | 1               | 40  | -  | -                                                 |
| 156                                                                                                     | 5         | 56     | 46                | -               | 46  | -  | -                                                 |
| 157                                                                                                     | 4         | 40     | 27                | -               | 27  | -  | -                                                 |
| 158                                                                                                     | 5         | 58     | 44                | -               | 43  | 1* | 1* Ei mit 20 Chromosomen + Fragment               |
| 159                                                                                                     | 5         | 57     | 44                | -               | 44  | -  | -                                                 |
| 160                                                                                                     | 5         | 51     | 42                | 2               | 40  | -  | -                                                 |
| 161                                                                                                     | 5         | 55     | 34                | -               | 34  | -  | -                                                 |
| 162                                                                                                     | 5         | 50     | 33                | -               | 33  | -  | -                                                 |
| 163                                                                                                     | 5         | 41     | 34                | -               | 34  | -  | -                                                 |
| 164                                                                                                     | 5         | 49     | 43                | -               | 43  | -  | -                                                 |
| 165                                                                                                     | 3         | 18     | 13                | -               | 13  | -  | -                                                 |
| 166                                                                                                     | 6         | 60     | 37                | -               | 37  | -  | 2 deg. Eier                                       |
| 167                                                                                                     | 6         | 60     | 47                | 1               | 46  | -  | -                                                 |
| 168                                                                                                     | 6         | 67     | 52                | 1               | 51  |    | 1 Oozyte in MI                                    |
| TOTAL                                                                                                   |           |        |                   |                 |     |    | *1 Ei mit 20 Chromosomen + Fragment               |
|                                                                                                         | 75        | 769    | 573               | 5               | 567 | 1* | 2 deg. Eier                                       |
|                                                                                                         |           |        |                   |                 |     |    | 1 Oozyte im MI-Stadium                            |
|                                                                                                         |           |        |                   |                 |     |    |                                                   |



Tab. 9

| Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus TRIMETHOPRIM-behandelten F1-Mäusen (Dosis: 1000mg/kg) |           |        |                   |                 |     |    |                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|-------------------|-----------------|-----|----|-------------------------------------------------------------------------------|
| Versuchs-Nr.                                                                                     | Mäusezahl | Eizahl | davon auswertbare | Chromosomenzahl |     |    | BESONDERHEITEN                                                                |
|                                                                                                  |           |        |                   | 19              | 20  | 21 |                                                                               |
| 169                                                                                              | 4         | 33     | 27                | 1               | 26  | -  | 2 Chromosomen in Chromatiden gespalten                                        |
| 170                                                                                              | 5         | 35     | 31                | -               | 31  | -  | -                                                                             |
| 171                                                                                              | 5         | 44     | 40                | 1               | 38  | 1* | *1 Ei mit 20 Chromosomen + Fragment                                           |
| 172                                                                                              | 6         | 53     | 43                | 2               | 41  | -  | -                                                                             |
| 173                                                                                              | 5         | 53     | 42                | -               | 42  | -  | -                                                                             |
| 174                                                                                              | 6         | 59     | 47                | 1               | 46  | -  | -                                                                             |
| 175                                                                                              | 6         | 58     | 49                | -               | 49  | -  | -                                                                             |
| 176                                                                                              | 6         | 60     | 44                | 1               | 43  | -  | -                                                                             |
| 177                                                                                              | 6         | 65     | 54                | -               | 54  | -  | -                                                                             |
| 178                                                                                              | 6         | 49     | 48                | 1               | 47  | -  | -                                                                             |
| 179                                                                                              | 6         | 50     | 39                | 1               | 38  | -  | -                                                                             |
| 180                                                                                              | 6         | 57     | 47                | -               | 47  | -  | -                                                                             |
| 181                                                                                              | 6         | 59     | 50                | 1               | 49  | -  | -                                                                             |
| TOTAL                                                                                            |           |        |                   |                 |     |    | 2 Chromosomen in Chromatiden gespalten<br>*1 Ei mit 20 Chromosomen + Fragment |
|                                                                                                  | 73        | 675    | 561               | 9               | 551 | 1* |                                                                               |
|                                                                                                  |           |        |                   |                 |     |    |                                                                               |
|                                                                                                  |           |        |                   |                 |     |    |                                                                               |

### 3.1.9 Ergebnisse mit ESIDRIX (vgl. Tabelle 10)

Es wurden von 82 Mäusen 657 Eier gewonnen (durchschnittlich 8,0 pro Weibchen). Auswertbar waren davon 500 Eier. Darunter waren 5 Eier mit 19 Chromosomen und 495 Eier mit  $n = 20$  Chromosomen. Metaphasen mit hyperhaploider Chromosomenzahl wurden nicht gefunden.

### 3.1.10 Ergebnisse mit KELFIZIN (vgl. Tabelle 11)

Kelfizin scheint in höheren Dosen für die Maus sehr giftig zu sein. Bei Dosen von 3000 bis 6000 mg/kg waren die Mäuse in ca. 30 Minuten tot. Mit einer Dosis von 1500 mg/kg wurde bei drei bearbeiteten Mäusen kein Ei in der Ampulle des Eileiters gefunden. Deswegen wurde als optimale Dosis 1000 mg/kg verwendet. So wurden 83 Mäuse bearbeitet und 726 Eier gewonnen, also pro Maus 8,7. Von den 547 auswertbaren Eiern waren 8 Eier mit 19 Chromosomen, 538 mit  $n = 20$  Chromosomen und in einer Metaphase eine Chromatid-Deletion mit Fragment. Von den gewonnenen 726 Eiern waren 20 Eier im MI-Stadium. Es schien so, als ob die Eier in der Meiose durch Wirkung von Kelfizin verzögert würden. Abbildung 30 zeigt die Metaphase mit Chromatid-Deletion + Fragment.

### 3.1.11 Ergebnisse mit NITROFURANTOIN (vgl. Tabelle 12)

Zuerst wurde als Dosis 200 mg/kg verwendet. Mit dieser Dosis waren die meisten Mäuse tot. Von den 7 überlebenden Mäusen wurden 65 Eier gewonnen (im Durchschnitt 9,3 pro Weibchen). Davon waren 58 Eier auswertbar und alle mit  $n = 20$  Chromosomen.

In einer zweiten Versuchsserie wurde die Dosis auf 100 mg/kg herabgesetzt. Es wurden 70 Mäuse bearbeitet und 633 Eier gewonnen (durchschnittlich 9,0 pro Maus). Davon waren 524 auswertbar, darunter ein Ei mit 19 Chromosomen und 523 Eier mit  $n = 20$  Chromosomen. Metaphasen mit hyperhaploider Chromosomenzahl wurden nicht gefunden (siehe Tabelle 12).

### 3.1.12 Ergebnisse mit ENTERO-VIOFORM (vgl. Tabelle 13)

Insgesamt wurden 77 Mäuse bearbeitet und 685 Eier gewonnen (8,9 pro Maus). 426 Eier waren auswertbar. Darunter waren 2 Eier mit 19 Chromosomen, 423 Eier mit  $n = 20$  Chromosomen und ein Ei mit 20 Chromosomen + 1 Stück. Auch Entero-Vioform ist für die Mäuse in höheren Dosen sehr giftig (optimale Dosis: 300 mg/kg). Abb. 31 zeigt das Ei mit 20 Chromosomen + 1 Stück.

### 3.1.13 Ergebnisse mit ortho-PHENYLENDIAMIN (vgl. Tabelle 14)

Nach Behandlung mit ortho-Phenylendiamin (Dosis: 216 mg/kg) wurden 48 Mäuse bearbeitet und insgesamt 346 Oozyten gewonnen (Mittelwert pro Weibchen 7,2). Davon waren 224 Eier auswertbar, darunter ein Ei mit 19 Chromosomen, ein Ei mit 19 Chromosomen + 1 Stück, 221 Eier mit  $n = 20$  Chromosomen und ein Ei mit 20 Chromosomen + 1 Stück. Abbildung 32 zeigt die Metaphase mit 20 Chromosomen + 1 Stück.

Tab. 10

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus ESIDRIX-behandelten Fl-Mäusen (Dosis: 600mg/kg)

| Versuchs-<br>Nr. | Mäusezahl | Eizahl | davon aus-<br>wertbare | Chromosomenzahl |     |    | BESONDERHEITEN                              |
|------------------|-----------|--------|------------------------|-----------------|-----|----|---------------------------------------------|
|                  |           |        |                        | 19              | 20  | 21 |                                             |
| 182              | 5         | 37     | 26                     | -               | 26  | -  | -                                           |
| 183              | 5         | 38     | 25                     | -               | 25  | -  | -                                           |
| 184              | 6         | 56     | 44                     | -               | 44  | -  | -                                           |
| 185              | 5         | 36     | 28                     | -               | 28  | -  | -                                           |
| 186              | 5         | 43     | 33                     | -               | 33  | -  | -                                           |
| 187              | 7         | 55     | 39                     | -               | 39  | -  | -                                           |
| 188              | 5         | 39     | 31                     | 2               | 29  | -  | -                                           |
| 189              | 3         | 21     | 15                     | -               | 15  | -  | -                                           |
| 190              | 5         | 42     | 30                     | -               | 30  | -  | -                                           |
| 191              | 5         | 39     | 35                     | 3               | 32  | -  | -                                           |
| 192              | 5         | 41     | 31                     | -               | 31  | -  | -                                           |
| 193              | 7         | 56     | 45                     | -               | 45  | -  | 1 Chromosom in 2 Chro-<br>matiden gespalten |
| 194              | 5         | 39     | 26                     | -               | 26  | -  | -                                           |
| 195              | 7         | 58     | 43                     | -               | 43  | -  | -                                           |
| 196              | 7         | 57     | 49                     | -               | 49  | -  | -                                           |
| TOTAL            |           |        |                        |                 |     |    | 1 Chromosom in 2 Chro-<br>matiden gespalten |
|                  | 82        | 657    | 500                    | 5               | 495 | -  |                                             |
|                  |           |        |                        |                 |     |    |                                             |

Tab. 11

| Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus KELFIZIN-behandelten F1-Mäusen (Dosis: 1000mg/kg) |           |        |                   |                 |     |    |                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------|-------------------|-----------------|-----|----|------------------------------------|
| Versuchs-Nr.                                                                                 | Mäusezahl | Eizahl | davon auswertbare | Chromosomenzahl |     |    | BESONDERHEITEN                     |
|                                                                                              |           |        |                   | 19              | 20  | 21 |                                    |
| 197                                                                                          | 2         | 15     | 15                | -               | 15  | -  | -                                  |
| 198                                                                                          | 5         | 34     | 15                | -               | 15  | -  | 9 Oozyten in MI                    |
| 199                                                                                          | 6         | 43     | 28                | -               | 28  | -  | 3 Oozyten in MI                    |
| 200a                                                                                         | 4         | 30     | 19                | -               | 19  | -  | -                                  |
| 200b                                                                                         | 4         | 38     | 30                | -               | 30  | -  | -                                  |
| 201                                                                                          | 5         | 37     | 29                | 2               | 27  | -  | -                                  |
| 202                                                                                          | 5         | 44     | 33                | -               | 33  | -  | -                                  |
| 203                                                                                          | 6         | 55     | 45                | -               | 45  | -  | -                                  |
| 204                                                                                          | 5         | 57     | 39                | 1               | 38  | -  | -                                  |
| 205                                                                                          | 6         | 57     | 44                | 1               | 42  | 1* | *1 Chromatid-Deletion mit Fragment |
| 206                                                                                          | 5         | 54     | 40                | -               | 40  | -  | -                                  |
| 207                                                                                          | 5         | 36     | 28                | 1               | 27  | -  | 1 Oozyte in MI                     |
| 208                                                                                          | 5         | 47     | 39                | 1               | 38  | -  | -                                  |
| 209                                                                                          | 4         | 38     | 33                | -               | 33  | -  | -                                  |
| 210                                                                                          | 5         | 37     | 28                | -               | 28  | -  | 2 Oozyten in MI                    |
| 211                                                                                          | 5         | 40     | 23                | -               | 23  | -  | 5 Oozyten in MI                    |
| 212                                                                                          | 6         | 64     | 59                | 2               | 57  | -  | -                                  |
| Total                                                                                        |           |        |                   |                 |     |    | 20 Oozyten im MI-Stadium           |
|                                                                                              | 83        | 726    | 547               | 8               | 538 | 1* | *1 Chromatid-Deletion mit Fragment |

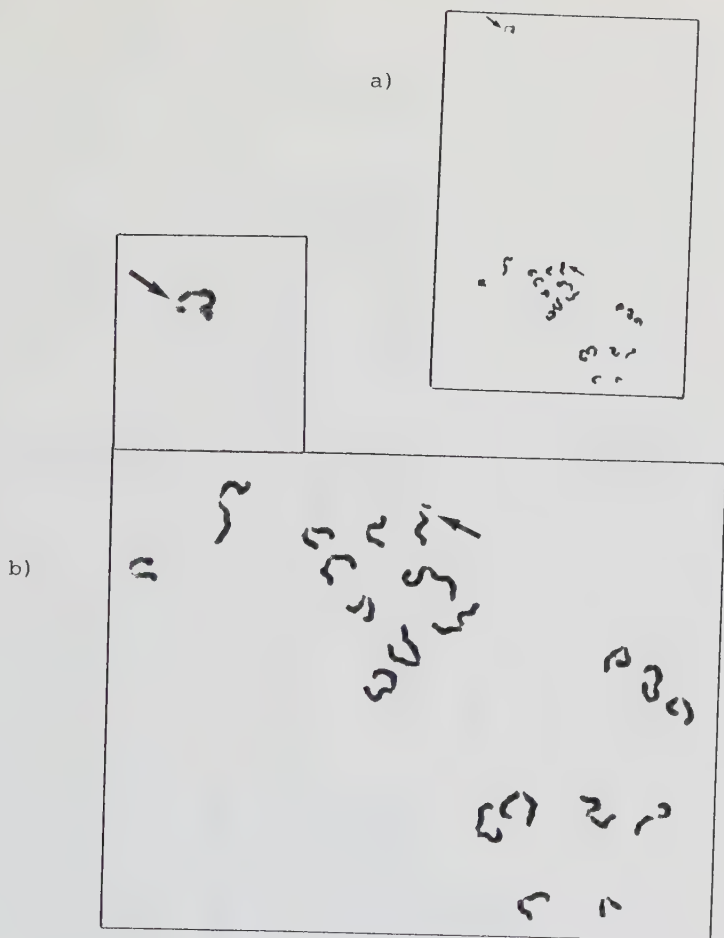


Abb. 30: Eine abnorme MII-Oozyte, die als "Metaphase mit Chromatid-Deletion + Fragment" gewertet wurde. Die beiden geschädigten Strukturen (Pfeile) lassen sich aber nicht völlig eindeutig als Chromosom oder Fragment einordnen. Gewonnen von einer KELFIZIN-behandelten F1-Maus.

a) Übersicht. Vergr.: ca. 180fach  
b) Vergrößert. (ca. 650fach)

Versuch Nr. 205/ Präparat Nr. 27/ hypot. Behandl.: 14'

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus NITROFURANTOIN-behandelten F1-Mäusen (Dosis: 200 und 100mg/kg)

|                | Versuchs-Nr. | Mäusezahl | Eizahl | davon auswertbare | Chromosomenzahl |     |    | BESONDERHEITEN |
|----------------|--------------|-----------|--------|-------------------|-----------------|-----|----|----------------|
|                |              |           |        |                   | 19              | 20  | 21 |                |
| DOSIS 200mg/kg | 213          | 5         | 50     | 45                | -               | 45  | -  | -              |
|                | 214          | 2         | 15     | 13                | -               | 13  | -  | -              |
|                | TOTAL        |           |        |                   |                 |     |    | -              |
|                |              | 7         | 65     | 58                | -               | 58  | -  |                |
| DOSIS 100mg/kg | 215          | 6         | 57     | 46                | -               | 46  | -  | -              |
|                | 216          | 6         | 60     | 52                | -               | 52  | -  | -              |
|                | 217          | 7         | 75     | 58                | -               | 58  | -  | -              |
|                | 218a         | 5         | 44     | 37                | -               | 37  | -  | -              |
|                | 218b         | 4         | 39     | 31                | -               | 31  | -  | -              |
|                | 219a         | 5         | 43     | 39                | -               | 39  | -  | -              |
|                | 219b         | 4         | 38     | 30                | -               | 30  | -  | -              |
|                | 220          | 2         | 19     | 15                | -               | 15  | -  | -              |
|                | 221          | 6         | 43     | 35                | -               | 35  | -  | -              |
|                | 222          | 3         | 19     | 19                | 1               | 18  | -  | -              |
|                | 223a         | 4         | 33     | 25                | -               | 25  | -  | -              |
|                | 223b         | 4         | 32     | 29                | -               | 29  | -  | -              |
|                | 224a         | 4         | 34     | 30                | -               | 30  | -  | -              |
|                | 224b         | 3         | 30     | 20                | -               | 20  | -  | 1 deg. Ei      |
|                | 225a         | 3         | 31     | 28                | -               | 28  | -  | -              |
|                | 225b         | 4         | 36     | 30                | -               | 30  | -  | -              |
| TOTAL          |              |           |        |                   |                 |     |    | 1 deg. Ei      |
|                |              | 70        | 633    | 524               | 1               | 523 | -  |                |

Tab. 13

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus ENTERO-VIOFORM-behandelten Fl-Mäusen (Dosis: 300mg/kg)

[illegible]

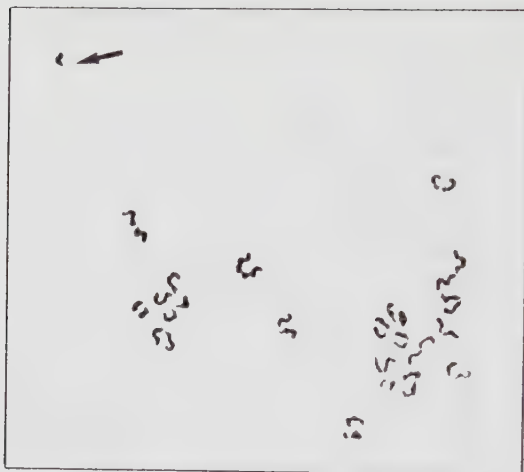


Abb. 31: Eine MII-Oozyte mit 20 Chromosomen  
und einem Stück.  
Gewonnen von einer ENTERO-VIOFORM-  
behandelten F1-Maus.

Der Pfeil zeigt auf das über-  
schüssige Stück.

Versuch Nr. 232/ Präparat Nr. 14/  
hypotone Behandlung: 16 Min.  
Vergr.: ca. 500fach

Tab. 14

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus ORTHO-PHENYLENDIAMIN-behandelten F1-Mäusen (Dosis: 216mg/kg)

| Versuchs-<br>Nr. | Mäusezahl | Eizahl | davon aus<br>wertbare | Chromosomenzahl |       |    | BESONDERHEITEN                                                                                                                |
|------------------|-----------|--------|-----------------------|-----------------|-------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                  |           |        |                       | 19              | 20    | 21 |                                                                                                                               |
| 242              | 4         | 41     | 27                    | 1               | 26    | -  | -                                                                                                                             |
| 243              | 4         | 31     | 18                    | -               | 18    | -  | -                                                                                                                             |
| 244              | 4         | 38     | 32                    | -               | 32    | -  | -                                                                                                                             |
| 245              | 8         | 55     | 29                    | -               | 29    | -  | -                                                                                                                             |
| 246              | 8         | 30     | 19                    | -               | 19    | -  | 1 Chromosom in 2 Chro-<br>matiden gespalten                                                                                   |
| 247              | 4         | 45     | 31                    | -               | 31    | -  | -                                                                                                                             |
| 248              | 4         | 36     | 28                    | -               | 28    | -  | -                                                                                                                             |
| 249              | 4         | 22     | 13                    | -               | 11+1* | 1* | *1 Ei mit 20 Chroms.+1Stk.<br>*1 Ei mit 19 Chroms..+1Stk.                                                                     |
| 250              | 8         | 48     | 27                    | -               | 27    | -  | -                                                                                                                             |
| F O A L          |           |        |                       |                 |       |    | 1 Chromosom in 2 Chro-<br>matiden gespalten<br>*1 Ei mit 20 Chromo-<br>somen + Stück<br>*1 Ei mit 19 Chromoso-<br>men + Stück |
|                  | 48        | 346    | 224                   | 1               | 22+1* | 1* |                                                                                                                               |
|                  |           |        |                       |                 |       |    |                                                                                                                               |
|                  |           |        |                       |                 |       |    |                                                                                                                               |

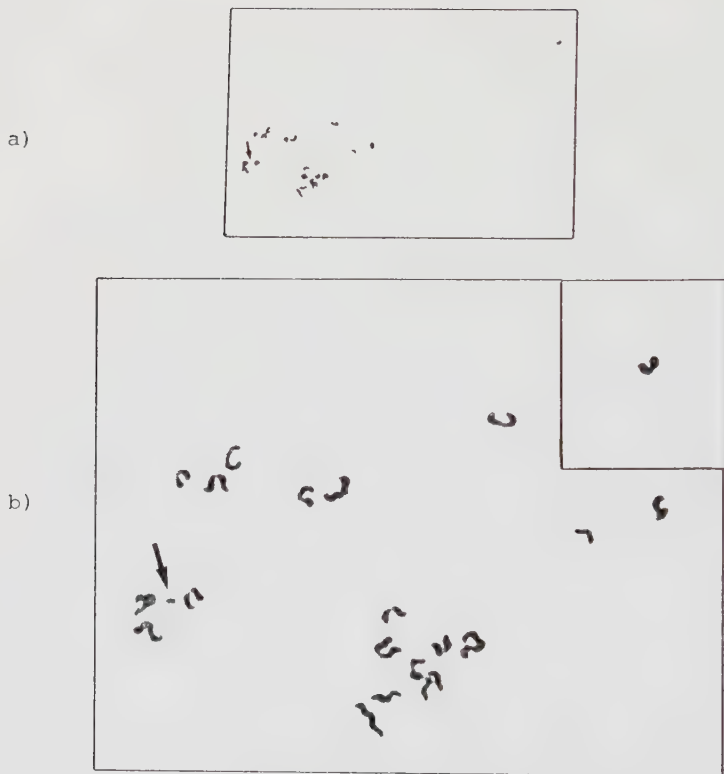


Abb. 32: Eine MII-Oozyte mit 20 Chromosomen + 1 Stück.  
Gewonnen von einem mit o-PHENYLENDIAMIN  
behandelten F1-Mäuseweibchen.

Der Pfeil deutet auf das überzählige Stück  
Chromosomenmaterial.

a) Übersicht. Vergrößerung ca. 150fach

b) Die gleiche Metaphase vergrößert (ca. 600fach)

Versuch Nr. 249/ Präparat Nr. 9/ hypot. Beh.: 19'

### 3.1.14 Ergebnisse mit COLCHICIN (vgl. Tabelle 15)

Es wurden verschiedene Versuche mit "Test-Colchicin" an MII-Oozyten durchgeführt, um die wirksame Dosis zur ND-Auslösung feststellen zu können. Zum Stoppen von Mäusezellen in der Metaphase wird Colchicin in vielen Laboratorien in einer Dosis von etwa 2 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Wenn Colchicin als ND-Auslöser geprüft werden soll, muß die verwendete Dosis so klein sein, daß nicht alle Metaphasen gestoppt werden. Daher wurde eine Serie von Versuchen mit den Dosen 2, 1, 0,5, 0,3, 0,2, 0,1 und 0,05 mg/kg durchgeführt. Mit den ersten drei Dosen waren alle Eier im MI-Stadium gestoppt. Abb. 33 zeigt ein so im MI-Stadium gestopptes Ei. Mit den Dosen unter 0,5 mg/kg dagegen liefen alle Eier bis zum MII-Stadium.

Mit den Dosen von 0,2 bis 0,05 mg/kg wurde je ein Versuch durchgeführt. Von den auswertbaren Eiern hatten alle  $n = 20$  Chromosomen. Nur eine Metaphase mit der Dosis 0,1 mg/kg zeigte 19 Chromosomen. In den weiteren Versuchen zur ND-Auslösung wurde die Dosis von 0,3 mg/kg verwendet, da bei einem einzigen Versuch mit dieser Dosis 2 von 22 auswertbaren MII-Oozyten abnorm gefunden wurden. Mit dieser Dosis wurden insgesamt 21 Mäuse bearbeitet und 200 Eier gewonnen. Von den auswertbaren 156 Eiern waren 125 mit  $n = 20$  Chromosomen und 31 mit 19 bis 23 Chromosomen (vgl. Tab. 15 unten). Der abnormale Anteil betrug ca. 20 % (31/156). Abbildung 34 zeigt ein Ei mit 23 Chromosomen und daneben 17 Polkörperchromosomen.

Eine Übersicht über die Ergebnisse mit allen hier untersuchten Substanzen an MII-Oozyten gibt die Tabelle 16.

Ergebnisse der Analyse von MII-Oozyten aus "Test-COLCHICIN"-behandelten FI-Mäusen

| Versuchs-Nr. | Dosis     | Mäusezahl | Eizahl | davon auswertbare | Chromosomenzahl |     |    |    |    | BESONDERHEITEN           |
|--------------|-----------|-----------|--------|-------------------|-----------------|-----|----|----|----|--------------------------|
|              |           |           |        |                   | 19              | 20  | 21 | 22 | 23 |                          |
| 251          | 2mg/kg    | 5         | 35     | 33                | -               | -   | -  | -  | -  | Alle Eier in MI gestoppt |
| 252          | 1mg/kg    | 9         | 74     | 70                | -               | -   | -  | -  | -  | "                        |
| 253a         | 1mg/kg    | 3         | 38     | 36                | -               | -   | -  | -  | -  | "                        |
| 253b         | 0,5mg/kg  | 3         | 36     | 32                | -               | -   | -  | -  | -  | "                        |
| 254a         | 0,1mg/kg  | 3         | 30     | 21                | 1               | 20  | -  | -  | -  | nicht gestoppt           |
| 254b         | 0,05mg/kg | 3         | 22     | 18                | -               | 18  | -  | -  | -  | "                        |
| 255a         | 0,2mg/kg  | 3         | 31     | 26                | -               | 26  | -  | -  | -  | "                        |
|              |           |           |        |                   |                 |     |    |    |    |                          |
| 255b         | 0,3mg/kg  | 3         | 29     | 22                | -               | 20  | 1  | 1  | -  | nicht gestoppt           |
| 256          | "         | 6         | 59     | 47                | 3               | 37  | 7  | -  | -  | "                        |
| 257          | "         | 6         | 47     | 36                | 3               | 27  | 5  | 1  | -  | "                        |
| 258          | "         | 6         | 65     | 51                | 1               | 41  | 7  | -  | 2  | "                        |
| Total        |           | 21        | 200    | 156               | 7               | 125 | 20 | 2  | 2  |                          |

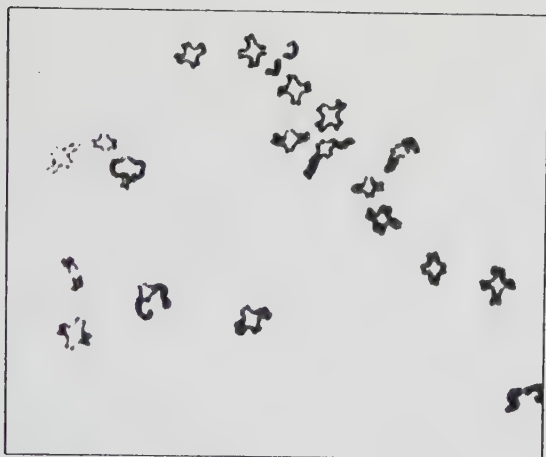


Abb. 33: Eine Oozyte mit 20 Bivalenten,  
im MI-Stadium gestoppt durch  
zu hoch dosiertes "Test-COLCHICIN".  
(Dosis: 0,5 mg/kg)  
Gewonnen von einer COLCHICIN-  
behandelten F1-Maus.

Versuch Nr. 253b/ Präparat Nr. 39/  
hypotone Behandlung: 9 Min.  
Vergr.: ca. 550fach

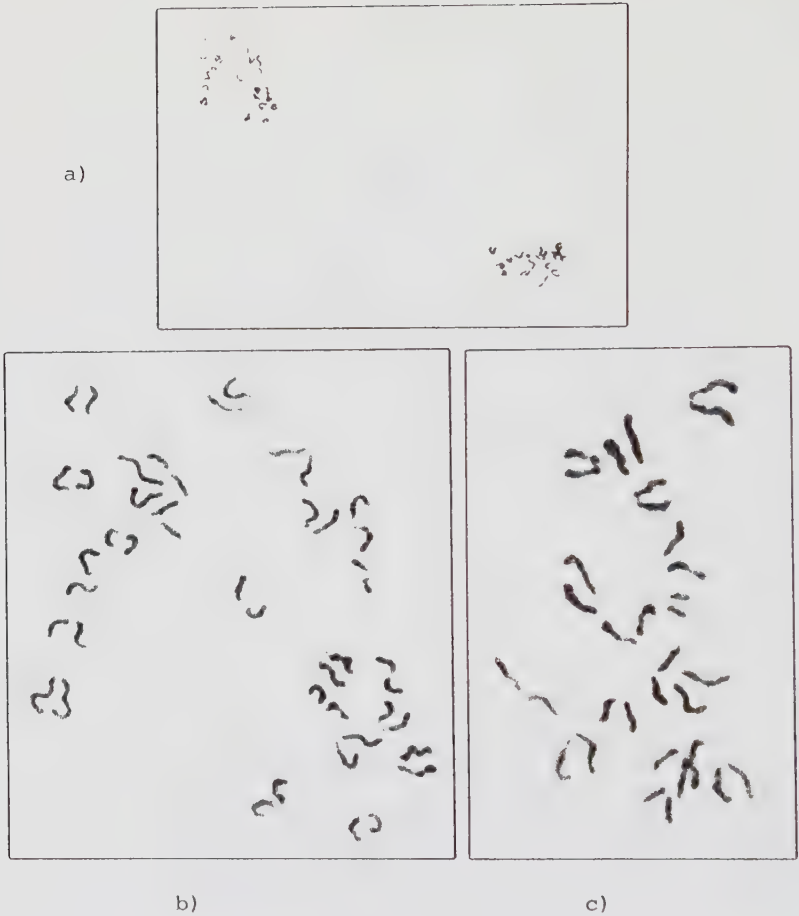


Abb. 34: Eine MII-Oozyte mit dem ersten Polkörper, beide in der Metaphase. Gewonnen von einer "Test-COLCHICIN"-behandelten F1-Maus. (Dosis: 0,3 mg/kg)

a) Übersicht: neben den 23 Ei-Chromosomen (links) erkennt man rechts die 17 Polkörper-Chromosomen.

Vergr.: ca. 150fach

b) Die 23 Eichromosomen. Vergr.: ca. 750fach

c) Die 17 Polkörperchromosomen. Vergr.: ca. 850fach

Versuch Nr. 258/ Präparat Nr. 13/ hypot. Behandl.: 9'

Übersicht über die untersuchten Substanzen und Ergebnisse in MII-Oozyten

| T e s t s u b s t a n z                      | Dosis     | auswertbare<br>Eizahl | Normal |    | A b e r r a t i o n e n |         |    |    |    |    |
|----------------------------------------------|-----------|-----------------------|--------|----|-------------------------|---------|----|----|----|----|
|                                              |           |                       | 20     | 19 | 19+(<1)                 | 20+(<1) | 21 | 22 | 23 | 40 |
| Kontrolle mit<br>C3H-Mäusen                  | -         | 535                   | 519    | 10 | -                       | 1       | 4  | -  | -  | 1  |
| Cyclophosphamid (C3H-M.)                     | 145mg/kg  | 537                   | 518    | 10 | 1                       | 2       | 4  | 1  | -  | 1  |
| Kontrolle mit F <sub>1</sub> -Mäusen         | -         | 651                   | 622    | 29 | -                       | -       | -  | -  | -  | -  |
| Cyclophosphamid (F <sub>1</sub> -M.)         | 145mg/kg  | 627                   | 607    | 18 | -                       | 1       | 1  | -  | -  | -  |
| p-Fluor-Phenylalanin<br>(F <sub>1</sub> -M.) | 300mg/kg  | 313                   | 302    | 10 | -                       | -       | -  | -  | -  | 1  |
|                                              | 500mg/kg  | 403                   | 399    | 3  | -                       | 1       | -  | -  | -  | -  |
| Sulfacetamid (F <sub>1</sub> -M.)            | 900mg/kg  | 574                   | 566    | 5  | -                       | -       | 2  | -  | -  | 1  |
| Aminopterin (F <sub>1</sub> -M.)             | 100mg/kg  | 109                   | 108    | 1  | -                       | -       | -  | -  | -  | -  |
|                                              | 200mg/kg  | 573                   | 567    | 5  | -                       | 1       | -  | -  | -  | -  |
| Trimethoprim (F <sub>1</sub> -M.)            | 1000mg/kg | 561                   | 551    | 9  | -                       | 1       | -  | -  | -  | -  |
| Esidrix (F <sub>1</sub> -M.)                 | 600mg/kg  | 500                   | 495    | 5  | -                       | -       | -  | -  | -  | -  |
| Kelfizin (F <sub>1</sub> -M.)                | 1000mg/kg | 547                   | 538    | 8  | -                       | 1       | -  | -  | -  | -  |
| Nitrofurantoin (F <sub>1</sub> -M.)          | 200mg/kg  | 58                    | 58     | -  | -                       | -       | -  | -  | -  | -  |
|                                              | 100mg/kg  | 524                   | 523    | 1  | -                       | -       | -  | -  | -  | -  |
| Entero-Vioform (F <sub>1</sub> -M.)          | 300mg/kg  | 426                   | 423    | 2  | -                       | 1       | -  | -  | -  | -  |
| o-Phenylendiamin (F <sub>1</sub> -M.)        | 216mg/kg  | 224                   | 221    | 1  | 1                       | 1       | -  | -  | -  | -  |
| Colchicin (F <sub>1</sub> -M.)               | 0,3mg/kg  | 156                   | 125    | 7  | -                       | -       | 20 | 2  | 2  | -  |

### 3.2. Untersuchungen an Embryonen

#### 3.2.1 Ergebnisse der Kontrolle (vgl. Tab. 17 und 18)

Wie schon beschrieben wurden die weiblichen F<sub>1</sub>-Mäuse zuerst mit den Hormonen PMS und HCG behandelt. 2 Stunden nach HCG-Behandlung wurden diese Weibchen ohne Substanzbehandlung mit Männchen gleichen Stammes verpaart. Nach der Vaginalpfropfuntersuchung wurden die Embryonen (befruchtete Eier) in verschiedenen Teilungsstadien zur Chromosomenanalyse präpariert, und zwar vom Ein-Zell- bis zum Blastocystenstadium. Die gewonnene Embryonenzahl pro Maus war sehr unterschiedlich und variierte zwischen 2 und 12.

Jeweils etwa 3-4 Stunden vor der Gewinnung der Embryonen wurden die Weibchen mit "Stop-Colchicin" (Dosis: 2 mg/kg) behandelt, um die Embryonalzellen in der Metaphase anzuhalten.

In den Versuchen an Ein-Zellstadien wurde die "Stop-Colchicin"-Behandlung, die bei 3-4stündiger Dauer immer nachts fällig gewesen wäre, auf etwa 15 Stunden ausgedehnt, um einen günstigeren Arbeitsrhythmus und eine höhere Ausbeute an Metaphasen zu erreichen. Um festzustellen, ob eine derartige Verlängerung der "Stop-Colchicin"-Behandlung ihrerseits vermehrt ND auslöst, wurden jedoch auch einige Versuche an Ein-Zellstadien mit nur 3-4stündiger Colchicin-Behandlung durchgeführt. Wie ein Vergleich dieser beiden Gruppen zeigt (a und b in Tab. 18), löst die verlängerte "Stop-Colchicin"-Behandlung aber keine ND aus.

Insgesamt wurden in der Kontrolle 54 Mäuse bearbeitet und 344 Embryonen in verschiedenen Entwicklungsstadien gewonnen (durchschnittlich 6,4 pro Weibchen). Von den 344 Embryonen waren insgesamt 60 auswertbar, und zwar alle mit  $2n = 40$  Chromosomen. Aberrante Embryonen wurden in der Kontrolle nicht gefunden. Tabelle 17 schlüsselt die Ergebnisse der Kontrolle für die einzelnen Entwicklungsstadien auf nach Embryonenzahl, Embryonen mit mindestens einer Metaphase und davon auswertbaren Embryonen. Tabelle 18 zeigt die Ergebnisse der Kontrolle entsprechend der Zeit (Stunden) nach HCG-Behandlung, zu der die Embryonen präpariert wurden. Abbildung 35 zeigt eine normale Metaphase mit  $2n = 40$  Chromosomen.

Ergebnisse der Untersuchung UNBEHANDELTER primplantativer  
Embryonen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium

| Stadium              | Embryonen-<br>zahl | Embr. mit<br>mind. einer<br>Metaphase | davon<br>auswertb.<br>Embryonen | Chromosomen-<br>zahl pro<br>Metaphase |    |      |
|----------------------|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|----|------|
|                      |                    |                                       |                                 | < 4o                                  | 4o | > 4o |
| Ein-Zell-<br>Stadium | 89                 | 87                                    | 27                              |                                       | 27 |      |
| 2-Zell-<br>Stadium   | 19                 | 5                                     | 4                               |                                       | 4  |      |
| 3-Zell-<br>Stadium   | 3                  | 1                                     | 0                               |                                       | 0  |      |
| 4-Zell-<br>Stadium   | 15                 | 4                                     | 0                               |                                       | 0  |      |
| 6-Zell-<br>Stadium   | 22                 | 18                                    | 2                               |                                       | 2  |      |
| 8-Zell-<br>Stadium   | 74                 | 39                                    | 6                               |                                       | 6  |      |
| 9-Zell-<br>Stadium   | 3                  | 3                                     | 1                               |                                       | 1  |      |
| 12-Zell-<br>Stadium  | 10                 | 8                                     | 2                               |                                       | 2  |      |
| 16-Zell-<br>Stadium  | 24                 | 5                                     | 0                               |                                       | 0  |      |
| Blastoc.-<br>Stadium | 85                 | 64                                    | 18                              |                                       | 18 |      |

| Präparat.-<br>zeit (h)<br>nach HCG | Embryonen-<br>Zahl | Embryonen<br>ohne<br>Metaphase                           | Embr. mit<br>mindestens<br>einer<br>Metaphase | davon                                                                  |                      | Z E L L S T A D I E N : |                     |                                                                   |                        |
|------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------|
|                                    |                    |                                                          |                                               | nicht<br>auswert-<br>bar                                               | aus-<br>wert-<br>bar | Ein-Zell<br>stadium     | 2-3 Zell<br>stadium | 4-8 Zell<br>stadium                                               | 12-16<br>Z.Stad.       |
| 24-28<br>(a) *                     | 17                 | 7x2Zell.<br>1x3Zell.                                     | 9                                             | 2x1Zell.                                                               | 7                    | 7x norm.<br>Ein-Zell.   |                     |                                                                   |                        |
| 36-40<br>(b) *                     | 85                 | 4x2Zell.<br>1x3Zell.                                     | 80                                            | 60x1Zell.                                                              | 20                   | 20x norm.<br>Ein-Zell.  |                     |                                                                   |                        |
| 48-52                              | 16                 | 1x2Zell.<br>9x4Zell.                                     | 6                                             | 1x2Zell.<br>1x3Zell.                                                   | 4                    |                         | 4x norm.<br>2-Zell. |                                                                   |                        |
| 53-70                              | 141                | 2x2Zell.<br>2x4Zell.<br>4x6Zell.<br>35x 8-Z.<br>20x16-Z. | 78                                            | 4x4Zell.<br>16x6Zell.<br>33x8Zell.<br>2x9Zell.<br>8x 12-Z.<br>4x 16-Z. | 11                   |                         |                     | 2x norm.<br>6-Z.<br>6x norm.<br>12-Z.<br>1x norm.<br>8-Z.<br>9-Z. | 2x<br>norm.<br>12-Z.   |
| 71-88                              | 85                 | 21x<br>Blastoc.                                          | 64                                            | 46x<br>Blastoc.                                                        | 18                   |                         |                     |                                                                   | 18x<br>norm.<br>Blast. |

Ergebnisse der Untersuchung UNBEHANDELTET primplantativer Embryonen  
in Abhängigkeit von der Preparationszeit nach HCG-Behandlung.  
\* Préparation ca. 3 Stunden (a) bzw. 15 Stunden (b) nach "Stop-Colchicin"-Behandlung

a)



b)

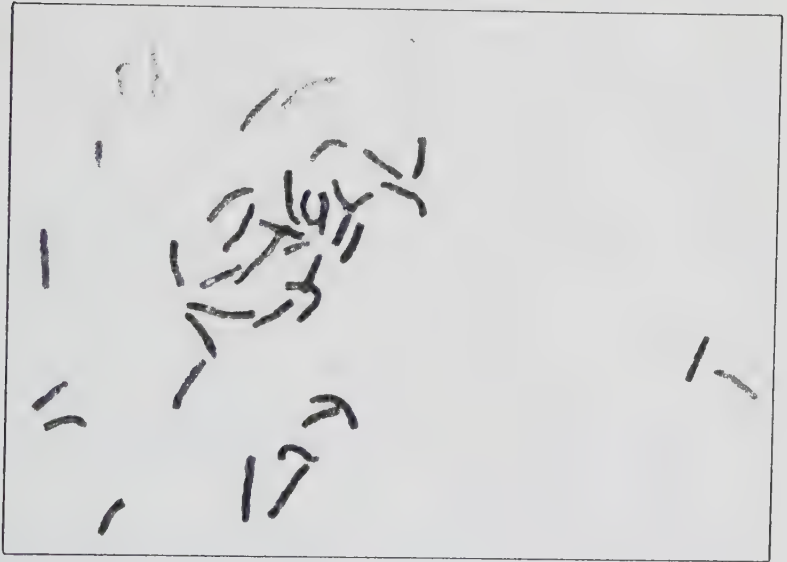


Abb. 35: Ein normaler Embryo im 2-Zellstadium, gewonnen von einem UNBEHANDELTEN F1-Weibchen (verpaart mit ebenfalls unbehandelten F1-Männchen).

a) Übersicht: beide Zellen sind in der Metaphase.

Vergr.: ca. 100fach

b) Eine der Metaphasen mit  $2n=40$  Chromosomen vergrößert.  
(ca. 550fach)

Versuch Nr. 267/ Präparat Nr. 6/ hypotone Behandl.: 11'

### 3.2.2 Ergebnisse an Embryonen unter Verwendung von "Test-Colchicin" (vgl. Tab. 19 und 20)

Die weiblichen F<sub>1</sub>-Mäuse wurden wie bei den Kontrollen zuerst mit den Hormonen PMS und HCG behandelt. 2 Stunden nach HCG-Behandlung wurde diesen Weibchen "Test-Colchicin" gespritzt (Dosis: 0,3 mg/kg) und anschließend wurden sie zu den Männchen gleichen Stammes gesetzt. Nach der Vaginalpfropffeststellung wurden die Embryonen in verschiedenen Zellstadien zur Chromosomenanalyse präpariert.

Die "Stop-Colchicin"-Behandlung erfolgte, genau wie in der Kontrolle, für die Ein-Zellstadien 15 Stunden, für alle anderen Stadien (2-Zell- bis Blastocystenstadium) 3 bis 4 Stunden vor der Präparation der Embryonen.

Es wurden insgesamt 50 Mäuseweibchen bearbeitet und 324 Embryonen in verschiedenen Teilungsstadien gewonnen (Durchschnitt über alle Stadien: 6,5 Embryonen pro Weibchen, wobei die Embryonenzahl pro Maus wie bei den Kontrollen zwischen 2 und 12 variierte). Davon waren 109 Embryonen auswertbar. Von diesen auswertbaren Embryonen waren insgesamt 37 normal mit  $2n = 40$  Chromosomen und 72 abnormal. Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse der "Test-Colchicin"-Versuche in einzelnen Zellstadien und Tabelle 20 die gleichen Ergebnisse nach Präparationszeit in Stunden, in denen sich die Embryonen befanden.

Tabelle 21 zeigt Mäusezahl, Embryonenzahl und Embryonenzahl pro Maus in Stunden nach HCG-Behandlung bei Kontrollen und Testversuchen.

Außer der sehr starken statistischen Schwankung der Embryonenzahl pro Weibchen muß hier ein systematischer Unterschied in der Ausbeute für verschiedene Stadien berücksichtigt werden, da frühe Embryonen mit einer anderen Technik gewonnen wurden als die späteren Stadien. Sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Versuchen wurden die Embryonen vom Ein-Zell- bis zum 8-Zellstadium durch das Zerreißen des Eileiters mit Pinzetten gewonnen, da das Ausblasen des Eileiters mit Flüssigkeit zu schwer ist. Daher ist nicht auszuschließen, daß einige Embryonen durch das Zerrei-

sen kaputt gegangen oder sogar sicherlich in den Stücken des zerrissenen Eileiters geblieben waren. Vom 8-Zell- bis zum Blastocystenstadium sind die Embryonen im Uterus. Da sich der Uterus mit Flüssigkeit gut durchblasen läßt, geht beim Gewinnen fast kein Embryo verloren.

Tabelle 22 zeigt die gesamten Ergebnisse mit Kontrollen und "Test-Colchicin"-Versuchen in einzelnen Zellstadien. Die meisten Aberrationen waren in frühen Entwicklungsstadien (Ein-Zell- bis 8-Zellstadium). Im Blastocystenstadium waren die Aberrationen im Vergleich zu den frühen Stadien erheblich niedriger.

Einige von diesen abnormalen Embryonen mit aberranten Chromosomenzahlen wurden ausgesucht und fotografiert. Die Abbildungen 36 bis 44 zeigen die Metaphasen.

Tab. 19

Ergebnisse der Untersuchung präimplantativer Embryonen von "Test-COLCHICIN"-behandelten F1-Weibchen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Embryonen

| Stadium             | Embryonen-<br>zahl | Embryonen<br>mit mind.<br>einer Meta | davon<br>auswert-<br>bar | Chromosomenzahl pro Metaphase |    |         |       |    |    |    |    |      |                                      |         |  |  |
|---------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|----|---------|-------|----|----|----|----|------|--------------------------------------|---------|--|--|
|                     |                    |                                      |                          | 20                            | 21 | 37      | 38    | 39 | 40 | 41 | 42 | 43   | 44 - 50                              | 53 - 65 |  |  |
| 1 Zell-<br>Stadium  | 74                 | 62                                   | 43                       |                               |    | (1) (2) | (8)   | 12 | 3  | 1  | 1  |      | 1x53, 2x57, 1x59<br>6x60, 2x64       |         |  |  |
| 2 Zell-<br>Stadium  | 102                | 54                                   | 31                       | 2                             |    |         | 1+(1) | 8  | 5  | 5  |    |      | 2x53, 3x58, 1x59<br>1x60, 1x61, 1x65 |         |  |  |
| 3 Zell-<br>Stadium  | 5                  | 4                                    | 3                        |                               |    |         |       |    |    |    |    |      | 1x57, 1x58, 1x64                     |         |  |  |
| 4 Zell-<br>Stadium  | 13                 | 7                                    | 4                        | 1                             |    |         |       | 2  |    |    |    | 1x47 |                                      |         |  |  |
| 6 Zell-<br>Stadium  | 11                 | 8                                    | 2                        | 1                             |    |         |       | 1  |    |    |    |      |                                      |         |  |  |
| 8 Zell-<br>Stadium  | 33                 | 25                                   | 7                        |                               |    |         | 1     | 1  | 1  | 2  |    |      | 1x58, 1x65                           |         |  |  |
| 9 Zell-<br>Stadium  | 3                  | 2                                    |                          |                               |    |         |       |    |    |    |    |      |                                      |         |  |  |
| 12 Zell-<br>Stadium | 14                 | 13                                   | 3                        |                               |    |         |       | 2  |    | 1  |    |      |                                      |         |  |  |
| 16 Zell-<br>Stadium | 17                 | 12                                   | 5                        |                               |    |         | 1     | 2  | 2  |    |    |      |                                      |         |  |  |
| 8-lasto-<br>Stadium | 52                 | 38                                   | 11                       |                               |    |         |       | 9  |    | 1  |    |      | 1x60 ?                               |         |  |  |

Werte in Klammern beziehen sich auf Embryonen mit nur einer auswertbaren hypodiploiden Metaphase.

| Präparat.-<br>zeit (h)<br>nach HCG | Embry-<br>onen-<br>zahl | Embryonen<br>ohne<br>Metaphase                                               | Embr. mit<br>mindestens<br>einer<br>Metaphase | d a v o n<br>nicht<br>auswert-<br>bar                       |    | Z E L L S T A D I E N :                  |                                                                                     |                             |                   | Blasto-<br>system |
|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|
|                                    |                         |                                                                              |                                               |                                                             |    | Ein-Zell<br>stadium                      | 2-3 Zell<br>stadium                                                                 | 4-8 Zell<br>stadium         | 12-16<br>Z.Stad.  |                   |
| 36-40                              | 99                      | 11x 1Zell.<br>24x 2Zell.<br>1x 3Zell.                                        | 63                                            | 19x 1Z.                                                     | 44 | 12 norm.<br>31 abn.                      | 1 abn. 2Z                                                                           |                             |                   |                   |
| 48-52                              | 86                      | 1x 1Zell.<br>24x 2Zell.<br>2x 4Zell.                                         | 59                                            | 23x 2Z.<br>1x 3Z.<br>1x 4Z.                                 | 34 | 8 norm. 2Z.<br>22 abn. 2Z.<br>3 abn. 3Z. | 1 norm. 3Z.                                                                         |                             |                   |                   |
| 53-70                              | 80                      | 3x 4Zell.<br>2x 6Zell.<br>8x 8Zell.<br>1x 9Zell.<br>1x 12Zell.<br>5x 16Zell. | 60                                            | 2x 4Z.<br>6x 6Z.<br>18x 8Z.<br>2x 9Z.<br>9x 12Z.<br>5x 16Z. | 18 |                                          | 1 norm. 4Z.<br>2 abn. 4Z.<br>1 norm. 5Z.<br>1 abn. 6Z.<br>1 norm. 8Z.<br>6 abn. 8Z. | 2 norm. 12Z.<br>1 abn. 12Z. |                   |                   |
| 71-88                              | 59                      | 1x 4Zell.<br>1x 5Zell.<br>14x Blast.                                         | 43                                            | 1x 12Z.<br>2x 16Z.<br>27x Bl.                               | 13 |                                          |                                                                                     | 1 abn. 14Z.<br>1 norm. 16Z. | 9 norm.<br>2 abn. |                   |

Ergebnisse der Untersuchung präimplantativer Embryonen von "Test-COLCHICIN"-behandelten F1-Weibchen in Abhängigkeit von der Präparationszeit nach HCG-Behandlung

Vergleich der mittleren Embryonen-Zahl pro Maus bei unbehandelten und "Test-Colchicin"-behandelten F1-Weibchen in Abhängigkeit von der Präparationszeit

| Präparations-<br>zeit (h) nach<br>HCG | K o n t r o l l e |                    |                       | Behandlung mit "Test-COLCHICIN"<br>(Dosis: 0,3 mg/kg) |                    |                       |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------|
|                                       | Mäusezahl         | Embryonen-<br>zahl | Embr.zahl<br>pro Maus | Mäusezahl                                             | Embryonen-<br>zahl | Embr.zahl<br>pro Maus |
| 24 - 28                               | 5                 | 17                 | 3,4                   | 13                                                    | 99                 | 7,6                   |
| 36 - 40                               | 16                | 85                 | 5,3                   |                                                       |                    |                       |
| 48 - 52                               | 3                 | 16                 | 5,3                   | 15                                                    | 86                 | 5,7                   |
| 53 - 70                               | 18                | 141                | 7,8                   | 14                                                    | 80                 | 5,7                   |
| 71 - 88                               | 12                | 85                 | 7,1                   | 8                                                     | 59                 | 7,4                   |

Vergleich der Häufigkeit aberranter Embryonen bei unbehandelten und "Test-Colchicin"-behandelten F1-Mäusen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium

| Stadium                | K o n t r o l l e |                     |                      |                     | Behandlung mit "Test-COLCHICIN" (Dos. 0,3mg/kg) |                     |                      |                     |
|------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-------------------------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
|                        | Embryonen<br>zahl | davon<br>auswertbar | Aberrations-<br>zahl | % Aberra-<br>tionen | Embryonen<br>zahl                               | davon<br>auswertbar | Aberrations-<br>zahl | % Aberra-<br>tionen |
| 1 Zell-<br>Stadium     | 89                | 27                  | -                    | -                   | 74                                              | 43                  | 31                   | 72                  |
| 2 Zell-<br>Stadium     | 19                | 4                   | -                    | -                   | 102                                             | 31                  | 23                   | 74                  |
| 3 Zell-<br>Stadium     | 3                 | -                   | -                    | -                   | 5                                               | 3                   | 3                    | 71                  |
| 4 Zell-<br>Stadium     | 15                | -                   | -                    | -                   | 13                                              | 4                   | 2                    |                     |
| 5-6 Zell-<br>Stadium   | 22                | 2                   | -                    | -                   | 11                                              | 2                   | 1                    | 77                  |
| 8 Zell-<br>Stadium     | 74                | 6                   | -                    | -                   | 33                                              | 7                   | 6                    |                     |
| 9 Zell-<br>Stadium     | 3                 | 1                   | -                    | -                   | 3                                               | -                   | -                    | 50                  |
| 12 Zell-<br>Stadium    | 10                | 2                   | -                    | -                   | 14                                              | 3                   | 1                    |                     |
| 14-16 Zell-<br>Stadium | 24                | -                   | -                    | -                   | 17                                              | 5                   | 3                    |                     |
| Blastocyst-<br>Stadium | 85                | 18                  | -                    | -                   | 52                                              | 11                  | 2                    | 18                  |
| T O T A L              | 344               | 60                  | -                    | -                   | 324                                             | 109                 | 72                   | 66                  |

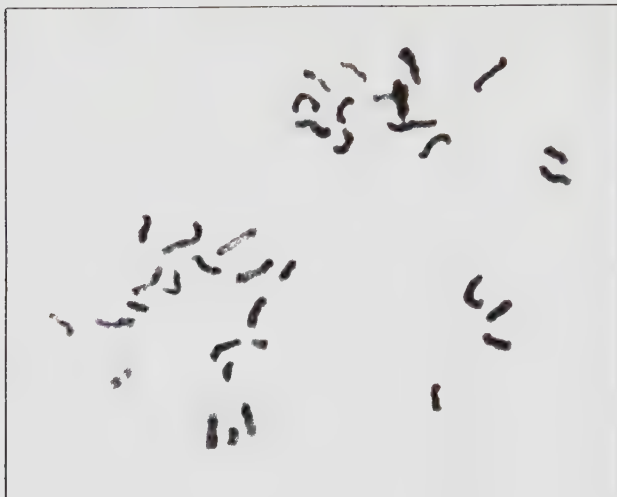


Abb. 36: Ein Embryo im Ein-Zellstadium mit 37 Chromosomen.  
Gewonnen von einem "Test-COLCHICIN"-behandelten F1-Weibchen (verpaart mit unbehandelten Männchen desselben Stammes).  
Versuch Nr. 273/ Präparat Nr.5/ hypotone Behandlung: 15 Min.  
Vergr.: ca. 650fach

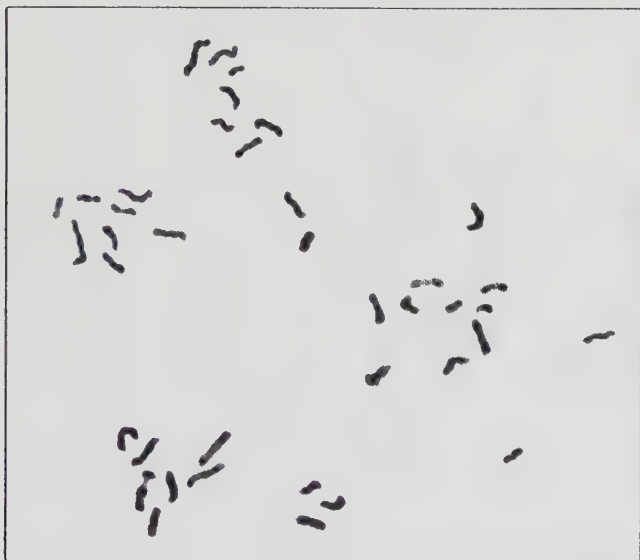


Abb. 37: Ein Embryo im Ein-Zellstadium mit 39 Chromosomen.

Gewonnen von einem "Test-COLCHICIN"-behandelten F1-Weibchen nach Verpaarung mit unbehandelten Männchen desselben Stammes.

Versuch Nr. 278/ Präparat Nr. 9/ hypotone Behandlung: 19 Min.

Vergr.: ca. 700fach

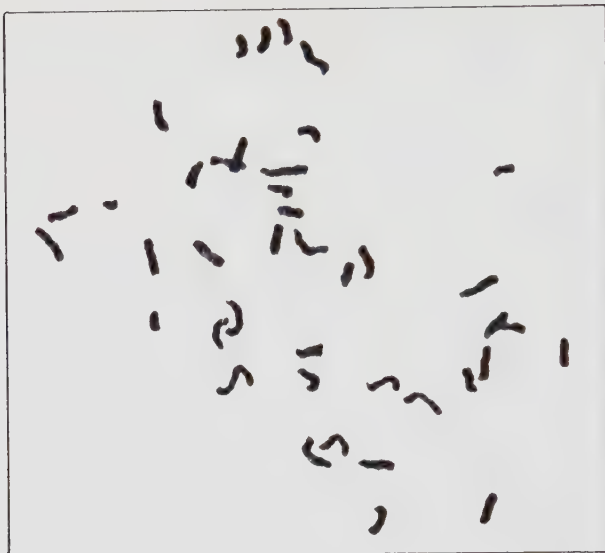


Abb. 38: Ein Embryo im Ein-Zellstadium mit 41 Chromosomen.  
Gewonnen von einem "Test-COLCHICIN"-behandelten F1-Weibchen nach Verpaarung mit unbehandelten Männchen desselben Stammes.

Versuch Nr. 278/ Präparat Nr. 7/  
hypotone Behandlung: 17 Min.  
Vergr.: ca. 650fach

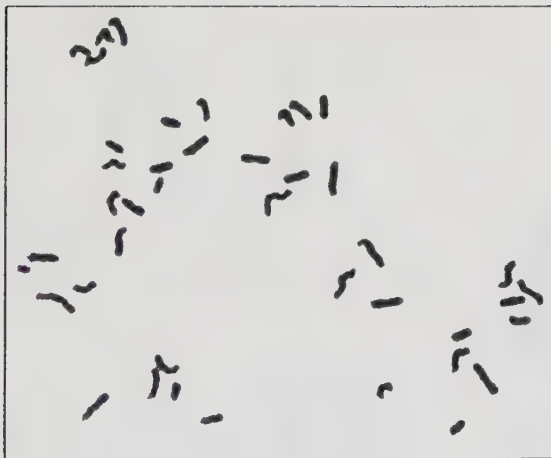


Abb. 39: Ein Embryo im Ein-Zellstadium mit  
42 Chromosomen.  
Gewonnen von einem "Test-COLCHICIN"-  
behandelten F1-Hybrid-Weibchen,  
verpaart mit unbehandelten F1-  
Männchen.

Versuch Nr. 273/ Präparat Nr. 7/  
hypotone Behandlung: 17 Min.  
Vergr.: ca. 350fach

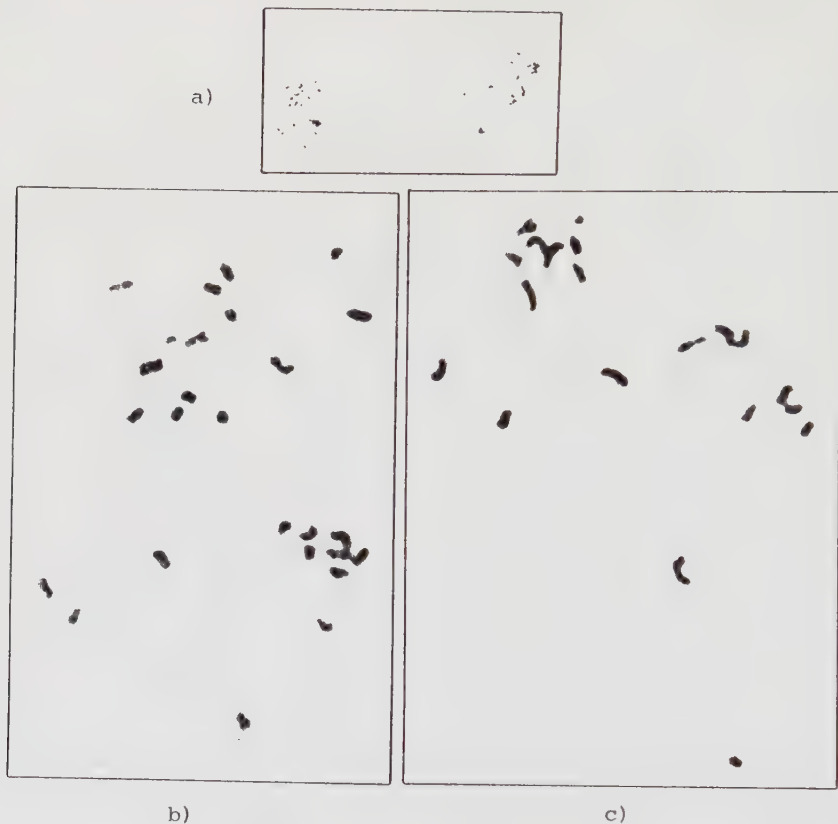


Abb. 40: Ein Embryo im Pronukleus-Stadium mit 20+26 Chromosomen. Gewonnen von einem "Test-COLCHICIN"-behandelten F1-Weibchen nach Verpaarung mit unbehandelten Männchen desselben Stammes.

- a) Übersicht über beide Pronuklei. Vergr.: ca. 80fach
- b) Der abnorme Pronukleus mit 26 Chromosomen.  
Vergr.: ca. 600fach
- c) Der normale, also vermutlich männliche Vorkern.  
Vergr.: ca. 600fach

Versuch Nr. 273/ Präparat Nr. 28/ hypotone Behandl.: 11'

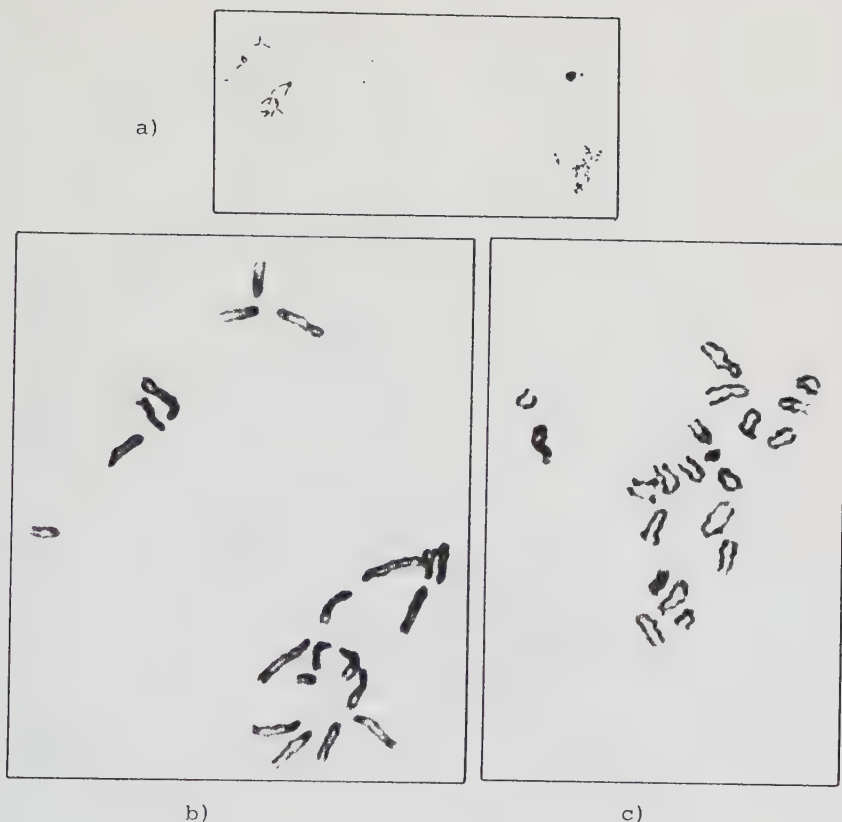
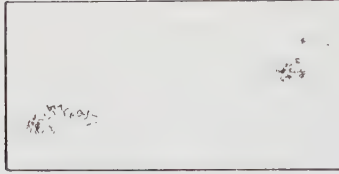


Abb. 41: Ein hyper-haploider Embryo im 2-Zellstadium mit zwei auswertbaren Metaphasen.  
Gewonnen von einem "Test-COLCHICIN"-behandelten F1-Weibchen nach Verpaarung mit unbehandelten F1-Männchen.  
a) Übersicht über beide Metaphasen. Vergr.: ca. 100fach  
b) Die linke Metaphase mit 21 Chromosomen. (ca. 550fach)  
c) Die rechte Metaphase, ebenfalls mit 21 Chromosomen. Vergr.: ca. 550fach

Versuch Nr. 279/ Präparat Nr. 6/ hypotone Behandl.: 16'

a)



b)

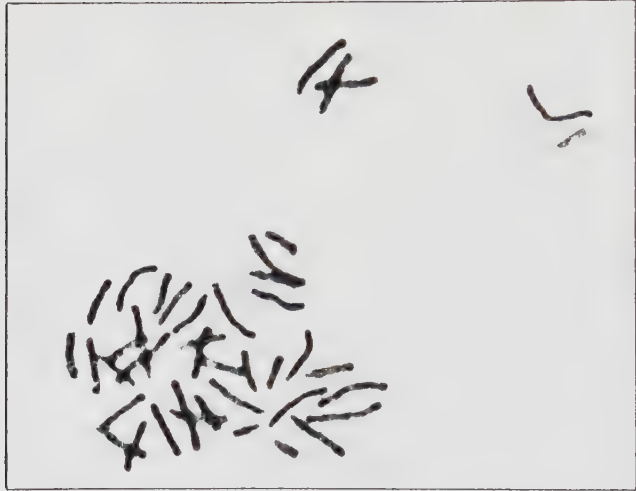


Abb. 42: Ein hyperdiploider Embryo im 2-Zellstadium mit zwei auswertbaren Metaphasen (jeweils 42 Chromosomen).

Gewonnen von einem "Test-COLCHICIN"-behandelten F1-Hybrid-Weibchen, verpaart mit unbehandelten Männchen gleichen Stammes.

- a) Übersicht über die beiden Metaphasen.  
Vergr.: ca. 70fach
- b) Die eine Metaphase mit 42 Chromosomen.  
Vergr.: ca. 700fach

Versuch Nr. 279/ Präparat Nr. 39/ hypotone Behandlung: 14 Min.

a)



b)

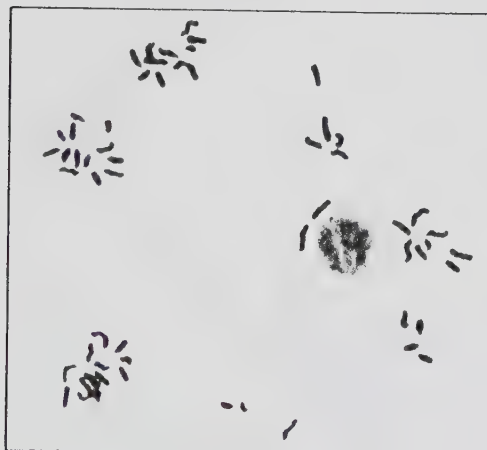


Abb. 43: Ein abnormer Embryo im 2-Zellstadium mit zwei auswertbaren Metaphasen (jeweils 57 Chromosomen). Gewonnen von einem "Test-Colchicin"-behandelten F1-Weibchen nach Verpaarung mit unbehandelten F1-Männchen.

a) Übersicht über beide Metaphasen.  
Vergr.: ca. 100fach

b) Eine der Metaphasen vergrößert.  
ca. 350fach

Versuch Nr. 282/ Präparat Nr. 1/  
hypotone Behandlung: 9 Min.

a)



b)



Abb. 44: Ein abnormer Embryo im 3-Zellstadium mit einer auswertbaren Metaphase.  
Gewonnen von einem "Test-COLCHICIN"-behandelten F1-Weibchen, verpaart mit unbehandelten F1-Männchen.

a) Übersicht.

Vergr.: ca. 100fach

b) Die Metaphase mit 64 Chromosomen.

Vergr.: ca. 600fach

Versuch Nr. 282/ Präparat Nr. 40/ hypotone  
Behandlung: 17'

#### 4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

##### 4.1 Versuche an MII-Oozyten

###### 4.1.1 Kriterien zur Auswertung der Metaphasen

###### 4.1.1.1 Gestörte Eientwicklung

Es wurden verschiedene Störungen der Eientwicklung beobachtet, die aber nichts mit einer ND zu tun haben, nämlich:

###### Störungen in der Polkörperbildung

Selten kommt es vor, daß der erste Polkörper nicht abgeschnürt wird und so im Ei bleibt. Dann hat das Ei im MII-Stadium 40 Chromosomen anstatt 20 und ist diploid (vgl. Abb. 21). In Kontroll- und Testversuchen mit C3H-Mäusen wurden solche Metaphasen je einmal beobachtet. Mit F<sub>1</sub>-Mäusen wurden jedoch in Kontrollversuchen keine, in Testversuchen zwei Metaphasen mit 40 Chromosomen gefunden. Ob diese Metaphasen spontan oder durch die Substanzwirkung entstanden waren, kann bei so kleiner Statistik nicht sicher beurteilt werden.

Da sich bei normalem Meioseverlauf der erste Polkörper, wenn er noch nicht abgestoßen ist, auch teilt, konnten manchmal Polkörperchromosomen außer den Eichrosomen im auszählbaren Stadium angetroffen werden, wenn nämlich der Polkörper synchron mit dem Eikern in der Metaphase war. Mit der Giemsa-Färbung sind Eichrosomen und Polkörperchromosomen leicht zu unterscheiden: Erstens sind die Eichrosomen sehr dunkel gefärbt, die Polkörperchromosomen dagegen deutlich schwächer. Zweitens zeigen die Polkörperchromosomen unter dem Mikroskop im Gegensatz zu den Eichrosomen vom Chromosom ausgehend fransenähnliche Strukturen. So kann man die 20 Chromosomen vom Ei und die vom Polkörper nebeneinander deutlich unterscheiden, obwohl die Polkörperchromosomen wegen ihrer schwachen Färbung meist nicht gut zu zählen sind.

Wird aber der Polkörper bei einer abnormen Meiose nicht abgeschnürt (Diploidie), oder bleiben ein bzw. einige Polkörperchromosomen im Ei (ND), so gleichen die im Ei gebliebenen Polkörperchromosomen völlig den Eichrosomen, sowohl in ihrer dunklen

Färbung als auch in der Form (keine Fransen). Offensichtlich wird diese Differenzierung der Chromosomengestalt durch Qualität oder Quantität noch nicht identifizierter Kontrollfaktoren des Cytoplasmas gesteuert.

#### Verlangsamter Ablauf der Eientwicklung

Es konnten auch MI-Oozyten zu dem Zeitpunkt, wo die Oozyten eigentlich schon im MII-Stadium sein mußten, gefunden werden. Ein paar solche Oozyten waren auch in den Kontrollen festzustellen. Das kann folgendermaßen erklärt werden: entweder kommen solche verzögerte MI-Oozyten unter den normalen MII-Oozyten selten spontan vor, oder aber sie könnten beim Trennen des Eileiters vom Ovar durch versehentliches Zerreißen des Ovars entstehen, wenn sie im Ovar schon zum MI-Stadium fortgeschritten, aber nicht zum Sprung gekommen waren. In jedem Fall sollten dann Kontrolleier und mit Substanz behandelte Eier einen gleichen Anteil an MI-Oozyten aufweisen.

Durch die Kelfizin-Behandlung aber wurde deutlich, daß die Meioseverzögerung durch die Substanzwirkung wesentlich gesteigert wird. Mit der Kelfizin-Dosis von 1500 mg/kg waren keine Eier zum normalen Zeitpunkt zum Sprung gekommen. Erst mit der Dosis von 1000 mg/kg waren die Oozyten (wie üblich meistens im MII-Stadium) gesprungen. Darunter war im Vergleich zu den Kontrollen jedoch eine erhöhte Anzahl von MI-Oozyten zu finden (20 von 726 in den Testversuchen gegenüber 3 von 1402 in den Kontrollen). Genauso wie Kelfizin stoppt auch das Colchicin mit den Dosen von 0,5 bis 2 mg/kg die Eier im MI-Stadium, doch läßt es diese Eier ohne Hindernis rechtzeitig zum Sprung kommen. Offensichtlich werden die Oozyten durch die Kelfizin-Wirkung sowohl im MI-Stadium gestoppt als auch am Sprung gehindert. Es wird die Entwicklung des Eies durch Kelfizin verlangsamt, so daß die Eier erst mit großer Verspätung zum Sprung kommen.

#### Degenerierte Eier (vgl. Abb. 14)

Von jeder Maus waren neben intakten Eiern auch einige degenerierte Eier zu finden. Degenerierte Eier sehen meist aus

wie ein Embryo im Morula-Stadium mit unterschiedlich großen runden Formen. Morphologisch sind diese Eier leicht zu erkennen. Jedoch gehen die meisten solcher Eier schon bei der Hyaluronidase- oder Hypotonie-Behandlung kaputt. Einige wenige degenerierte Eier können präpariert und gefärbt werden, zeigen jedoch keine Chromosomen, ja nicht einmal einen Zellkern. Daher wurden degenerierte Eier nur am Anfang der Arbeit präpariert (vgl. Tab. 2). In den weiteren Versuchen wurden degenerierte Eier nicht mehr präpariert, solange sie morphologisch als solche gesichert waren.

Die Frage, ob solche Eier eventuell schon vorher chromosomal abnorm waren, bleibt ebenso offen wie die Frage, durch welchen Mechanismus solche Eier eliminiert werden. Von degenerierten Eiern zu unterscheiden sind

geschrumpfte Eier.

Solche Oozyten mit einem großen Raum zwischen dem Ei und der Zona pellucida finden sich häufig unter überalterten Oozyten, die unbefruchtet in die Anaphase II eingegangen sind.

Sowohl in den Versuchen als auch in der Kontrolle kamen aber auch unter den frisch gesprungenen MII-Oozyten einige geschrumpfte vor. Diese gingen meist schon vor der Präparation kaputt. Wenn es gelang, sie zu präparieren, ließen sich im Gegensatz zu den degenerierten Eiern auch Chromosomen finden, doch waren die Metaphasen meist schlecht auswertbar.

Bei den Versuchen mit "Test-Colchicin" (und nur bei dieser Substanz!) zeigten aber die meisten frisch gesprungenen Oozyten einen großen Raum zwischen Ei und Zona pellucida, ließen sich jedoch gut präparieren und zeigten überwiegend normale Metaphasen.

#### 4.1.1.2 Hypohaploidie und Hyperhaploidie

In allen Kontroll- und Testversuchen dieser Arbeit, auch in vergleichbaren Arbeiten aus der Literatur, ist das Vorkommen von Hypohaploidien häufiger als das von Hyperhaploidien.

Nach Röhrborn und Hansmann (13)

"könnten dafür vier Gründe vorliegen:

1. Eine Pulverisierung einzelner Chromosomen nach oder vor der Behandlung in der Metaphase I könnte das Vorherrschen hypoploider Kerne in der Metaphase II bewirken.
2. Hyperploide Kerne könnten bevorzugt in den ersten Polkörper abgeschnürt werden, d.h. diese hyperploiden Kerne können in der Metaphase II nicht gefunden werden.
3. Das Vorherrschen hypoploider Kerne in den Kontrollen könnte auch auf dem Degenerieren der Hyperploiden während des langen Diktyotän-Stadiums beruhen.
4. Das Vorherrschen der hypoploiden Kerne könnte ein Artefakt sein, d.h. Chromosomen könnten während des Fixierens verlorengehen."

Daß ein Chromosom beim Fixieren verlorengehen kann, ist durchaus möglich. Es wurden mehrere Fälle bei der vorliegenden Arbeit beobachtet, in denen nach langem Suchen das fehlende Chromosom weit ab von der Metaphase noch gefunden wurde. Daher dürfte man die hypohaploiden Metaphasen prinzipiell nicht als ND bewerten. Es wurden deswegen bei dieser vorgelegten Arbeit zur Auswertung nur die Hyperhaploidien herangezogen. Da die Hypohaploidien zumeist auf Artefakte zurückzuführen sind, bleibt die Frage offen, wie häufig solche Aberrationen wirklich vorkommen.

Eine Ausnahme in dieser Hinsicht stellen die Colchicin-Versuche an MII-Oozyten dar. Unter 31 aberranten Oozyten von 156 wurden nur 7 Hypohaploidien, aber 24 Hyperhaploidien gefunden. Wenn man annimmt, daß einige von diesen 7 Hypohaploidien auch durch Präparationsfehler entstanden sein könnten, dann wäre das Vorkommen von Hyperhaploidien fast fünffach mehr als das von Hypohaploidien. Anscheinend bleiben bei einem Spindeldefekt überzählige Chromosomen im Ei liegen, anstatt in den Polkörper eingeschlossen zu werden. Generell wurden die Hypohaploidien zwar

in den Tabellen angegeben, nicht aber als ND bewertet.

#### 4.1.1.3 Chromosomen, Chromatiden und Chromosomenstücke

Alle Mäusechromosomen sind akrozentrisch. Daher kann man die einzelnen Chromosomen ohne Bandentechniken morphologisch kaum voneinander unterscheiden. Das erschwert auch die Unterscheidung zwischen den in Chromatiden gespaltenen Chromosomen und vorkommenden Chromosomenstücken, sogar auch zwischen den gespalten vorkommenden Chromatiden und normalen Chromosomen, wenn diese sehr kondensiert sind (egal, ob durch Substanzwirkung oder Präparationsfehler entstanden). Es besteht daher immer eine Fehler-Gefahr, wenn die Chromatiden anstatt der Chromosomen ausgewertet werden, wie manche Wissenschaftler es bevorzugen, denn man kann nicht immer sicher beurteilen, ob diese nun wirklich Chromatiden oder Chromosomenstücke oder sogar Chromosomen wären. Bei der in dieser Arbeit benutzten Aufarbeitungstechnik konnte die Aufspaltung in Chromatiden fast gänzlich vermieden werden. Es kamen selten in Chromatiden gespalte Chromosomen in den Metaphasen vor. Diese wurden in den Tabellen aufgeführt, aber nicht als ND bezeichnet. Als ND wurden nur Metaphasen mit überzähligen Chromosomen bewertet. Die Frage, ob die in Chromatiden gespaltenen Chromosomen und die Chromosomenstücke durch Substanzeinwirkung oder Präparationsfehler entstehen, wird in 4.1.2.1 diskutiert.

#### 4.1.2 Die spontane Häufigkeit der Hyperhaploidien in MII-Keimzellen

Die spontane Häufigkeit für ND (Hypo- und Hyperhaploidie) in MII-Keimzellen weiblicher Mäuse wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bestimmt (Röhrborn und Hansmann (13), Röhrborn und Hansmann (37), Hansmann (38), Hansmann und El-Nahass (39), Uchida und Lee (40), Shimada et al. (41), Martin et al. (42) und Reichert et al. (43)). Da die Hypohaploidien, wie schon erwähnt, nicht mit absoluter Sicherheit richtige Werte liefern (aufgrund von Präparationsfehlern), sollten ausschließlich die

Tab. 23

Spontane Häufigkeit der Hyperhaploidien in MII-Oozyten  
von etwa 3 - 6 Monate alten Mäusen

| Autor, Jahr                      | Mäuse-<br>stamm | Auswertung nach           |                           | Hyperhaploide<br><br>Auswertbare | %   |
|----------------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----|
|                                  |                 | Chromo-<br>somen-<br>Zahl | Chroma-<br>tiden-<br>Zahl |                                  |     |
| Röhrborn &<br>Hansmann, 1971     | C3H             |                           | +                         | 1/ 95                            | 1,1 |
|                                  | (101xC3H)F1     |                           | +                         | 5/ 81                            | 6,2 |
| Röhrborn &<br>Hansmann, 1974     | C3H             | ?                         | ?                         | 3/ 128                           | 2,3 |
| Hansmann, 1974                   | C3H             | ?                         | ?                         | 8/ 335                           | 2,4 |
| Hansmann &<br>El-Nahass,<br>1979 | C3H             | +                         |                           | 4/1302                           | 0,3 |
|                                  | (101xC3H)F1     | +                         |                           | 3/ 740                           | 0,4 |
|                                  | NMRI            | +                         |                           | 3/1296                           | 0,2 |
| Uchida & Lee,<br>1974            | (C3HxICR)F1     | +                         |                           | 0/1054                           | 0,1 |
| Shimada<br>et al., 1976          | ddY             | +                         |                           | 0/ 199                           | 0,5 |
| Martin<br>et al., 1976           | CBA             | +                         |                           | 0/ 187                           | 0,5 |
| Reichert<br>et al., 1975         | NMRI            | +                         |                           | 0/ 143                           | 0,7 |
| Ergebnisse<br>dieser Arbeit      | C3H             | +                         |                           | 4/ 535                           | 0,7 |
|                                  | (C3HxC57B1)F1   | +                         |                           | 0/ 651                           | 0,2 |

Hyperhaploidien als ND berücksichtigt werden. Die von diesen Autoren gefundenen Spontanhäufigkeiten für Hyperhaploidien sind in Tabelle 23 aufgeführt. Mit Ausnahme der Pionier-Arbeiten aus der Röhrborn-Hansmann-Gruppe liegen alle gefundenen Spontanhäufigkeiten für Hyperhaploidien deutlich unter 1 %.

Auch in der Spermatogenese der Maus liegt der spontane Anteil der ND in vergleichbarer Höhe, wie Arbeiten von Szemere und Chandley (44) mit 0/200 ( $< 0,5$  %) und Beatty et al. (45) mit 10/5200 (0,2 %) Hyperhaploidien zeigen. Eine auffallend hohe ND-Spontanrate wurde mit 1/58 (1,7 %) Hyperhaploidien von Scott und Long (46) in der Spermatogenese des Pferdes gefunden. Scott und Long zitieren Arbeiten an Widdern und Bullen, in denen ähnlich hohe Werte berichtet wurden.

Untersuchungen über die spontane Häufigkeit von ND in der Oogenese anderer Säuger wurden von Watanabe et al. (47) am Goldhamster und von Hansmann et al. (48) am chinesischen Hamster durchgeführt. Für diese Säuger, deren Chromosomen viel leichter zu unterscheiden sind als die der Maus, wird die spontane Häufigkeit der Hyperhaploidien 1/143 (0,7 %) (47) bzw. 0/200 ( $< 0,5$  %) (48) angegeben, also eine spontane Häufigkeit, wie sie auch in den meisten Arbeiten an Mäuse-Oozyten gefunden wurde. Entsprechende Daten liegen für den Menschen aus begreiflichen Gründen nicht vor.

Die Frage, warum in den älteren Arbeiten der Röhrborn-Hansmann-Gruppe, wie die Tabelle 23 zeigt, eine höhere ND-Spontanrate an MII-Mäuseoozyten gefunden wurde, kann möglicherweise mit der Aufarbeitungstechnik und Auswertung der Metaphasen beantwortet werden. Die Autoren selbst nehmen in ihren späteren Arbeiten dazu leider nicht Stellung.

#### 4.1.2.1 Technische Fragen

Die Ausbeute an auswertbaren Metaphasen und die Spaltung der Chromosomen in Chromatiden sind von der Konzentration der hypotonen Lösung abhängig: verwendet man 1 %ige  $\text{Na}_3$ -Citrat-Lösung (für 9-16 Minuten), so ist die Zahl der auswertbaren Metaphasen

zwar niedrig, doch waren die Chromosomen nur ganz selten in Chromatiden gespalten. Je stärker hypoton die Lösung angesetzt wurde (0,7 - 0,9 %), desto größer war jedoch die Häufigkeit der in Chromatiden gespaltenen Chromosomen (besonders bei C3H-Mäusen). Allerdings erhöhte sich damit zugleich die Ausbeute der auswertbaren Metaphasen. Während solche in Chromatiden gespaltenen Chromosomen als Artefakte durch die Präparation vorkamen, gab es auch Metaphasen mit Substanz-Behandlung, die mit einer ungeraden Zahl überschüssiger Chromatiden oder mit Stücken von Chromatiden gefunden wurden. Das heißt, daß solche Aberrationen, wenn auch in sehr geringer Zahl, wohl durch die Substanzwirkung entstanden sind. Die Frage, wie häufig und durch welchen Mechanismus solche Aberrationen von den Substanzen erzeugt werden, bleibt offen.

In der Arbeit von Röhrborn und Hansmann (13) wird nicht begründet, warum die Metaphasen durch Zählung der Chromatiden anstatt der Chromosomen ausgewertet wurden. Es ist aber anzunehmen, daß die Autoren wegen ihrer Aufarbeitungstechnik (z.B. längere Hypoton-Behandlung für 60 Minuten) häufig mehrere Chromosomen in Chromatiden gespalten fanden und daher beschlossen, die Chromatidenzahl auszuwerten. Dabei wurden die Metaphasen mit einem überzähligen Chromatid oder Chromatidenstück auch als ND bezeichnet und ausgewertet. All das wären Gründe dafür, daß diese Autoren in ihren früheren Arbeiten eine höhere spontane Häufigkeit für Hyperhaploidien an MII-Mäuseoozyten fanden. Die niedrige ND-Spontanrate an MII-Oozyten bestätigt sich in der jüngsten Arbeit von Hansmann (39), in der an denselben Mäusestämmen wie in den früheren Arbeiten nach Chromosomenzählung niedrigere Spontanwerte für Hyperhaploidien (0,2 - 0,4 %) gefunden wurden.

Eine andere Frage, die hier beantwortet werden muß, ist, welche anderen Faktoren die spontane Häufigkeit von ND noch beeinflussen könnten. Als Faktoren, die solche Artefakte setzen könnten, kämen in Frage: die benutzten Hormone, das Alter der Mäuse und die Stammesunterschiede. Es sollen nun diese Faktoren

einzelnen diskutiert werden.

#### 4.1.2.2 Hormon-Behandlung

In den meisten Laboratorien werden die Hormone (PMS, HCG) zur Stimulation der Ovulation verwendet. Dabei ist zu bedenken, daß die Hormone selbst schon zu Chromosomenaberrationen führen könnten, und daß die Hormonapplikation einer der Gründe von unterschiedlichen Kontrollergebnissen an MII-Oozyten in den bisher veröffentlichten Arbeiten sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurden zwar keine unterschiedlichen Hormon-Konzentrationen getestet. Da aber in der Kontrolle von  $F_1$ -Mäuseweibchen mit der verwendeten Hormongabe ( 2 I.E. PMS, 2 I.E. HCG) unter 651 auswertbaren Oozyten keine Hyperhaploidie gefunden wurde, hat zumindest diese Konzentration von Hormonen offenbar keinen nennenswerten ND-auslösenden Effekt. Das deckt sich mit den Ergebnissen von Röhrborn (49), der bei C3H-Mäuseweibchen mit einer Hormongabe (1,5 I.E. PMS, 2 I.E. HCG) unter 335 auswertbaren Metaphasen 8 Hyperhaploidien (2,4 %), ohne Hormongabe unter 128 Metaphasen 3 Hyperhaploidien (2,3 %) fand. Es konnte also kein Hormoneinfluß auf die spontane Häufigkeit von Hyperhaploidien festgestellt werden. Ebenfalls haben Hansmann und El-Nahass (39) mit weiblichen Mäusen von drei Stämmen, C3H/Han, NMRI/Han und  $(101 \times C3H)F_1$ , zur Feststellung der Hormonwirkung Untersuchungen gemacht. Die Chromosomenanalyse von 3338 auswertbaren MII-Oozyten zeigte, daß weder die niedrigen (1,5 I.E. PMS, 1 I.E. HCG) noch die höheren (10 I.E. PMS, 10 I.E. HCG) Dosen von Hormonen eine Wirkung auf das Vorkommen von ND während der ersten meiotischen Teilung in diesen drei Stämmen von Mäusen hatten.

Sowohl eigene Ergebnisse als auch Ergebnisse anderer Arbeiten mit Hormongabe zeigen also, daß die Hormone mindestens mit niedrigen Dosen keinen Einfluß auf die Erzeugung der ND in MII-Oozyten haben.

#### 4.1.2.3 Alter der behandelten Mäuseweibchen

Es wird allgemein angenommen, daß die Chromosomenaberrationen sich mit zunehmendem maternalen Alter erhöhen. Das fortgeschrittene maternale Alter bei Säugetieren ist mit reduzierter Fertilität assoziiert. Viele Annahmen in dieser Hinsicht basieren darauf, daß die Meiose bei den weiblichen Säugetieren im sogenannten Diktyotän-Stadium für lange Zeit im foetalen Ovarium zum Stehen kommt und bis zur Ovulation im erwachsenen Tier nicht fortgeführt wird. Dieses Diktyotän-Stadium dauert bei manchen Oozyten (den letzten Oozyten) bis zum Ende des reproduktiven Lebens des Weibchens (ca. 2 Jahre bei der Maus). Da die Häufigkeit der Aneuploidien mit fortschreitendem maternalen Alter zunimmt, wird vermutet, daß Veränderungen in Oozyten während des längeren Diktyotän-Stadiums die Häufigkeit von ND erhöhen.

Luthardt et al. (50) haben Oozyten mit einem Keimbläschen aus Ovarien von 6 Wochen bis 15 Monate alten Mäusen gewonnen und bis zum MI-Stadium kultiviert. Nach der Präparation im MI-Stadium wurden die Chromosomen gezählt. Da die Mäuse im MI-Stadium normalerweise 20 Bivalente haben, wurde auf das Vorkommen von Univalenten untersucht. Die Autoren fanden eine signifikante Erhöhung an Univalenten mit zunehmendem Alter der weiblichen Mäuse. Außerdem wurden unter 1436 auswertbaren MI-Oozyten 5 mit 21 Bivalenten gefunden. 4 von diesen wurden von 10 Monate alten oder noch älteren Mäusen gewonnen.

In ähnlicher Weise haben Uchida und Freeman (51) Oozyten von Mäusen in zwei Altersgruppen (3 - 6 Monate und 12 Monate) im MII-Stadium auf Hyperhaploidie untersucht. Es wurden bei jüngeren Mäusen von 1054 auswertbaren MII-Oozyten keine Hyperhaploidie, bei älteren Mäusen von 1306 Oozyten 4 Hyperhaploidien gefunden.

Die zitierten Arbeiten zeigen deutlich, daß die Chromosomenaberrationen sich mit zunehmendem Alter des Weibchens erhöhen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuseweibchen waren sämtlich, wie schon erwähnt, 3 - 6 Monate alt. Die meisten waren 3 Monate alt. Da diese Altersgruppe zu den jüngeren Mäusen gezählt wird, sollte das Alter der benutzten Mäuseweibchen in den

Ergebnissen an MII-Oozyten keine Rolle spielen.

#### 4.1.2.4 Mäusestämme

Eigene Ergebnisse an C3H-Inzucht- und (C3H x C57B1) $F_1$ -Mäuseweibchen zeigen, daß der genetische Hintergrund die ND-Rate beeinflußt. Die Arbeit von Röhrborn und Hansmann (13) bestätigt das. Während Röhrborn und Hansmann aber für den Inzuchtstamm C3H eine geringere ND-Rate finden als für die (101 x C3H) $F_1$ -Hybriden, zeigen bei den eigenen Ergebnissen gerade die Hybriden (wenn auch hier mit C57B1) weniger ND, so daß man - über die grundlegende Wichtigkeit des genetischen Hintergrundes hinaus - keine weiteren Schlüsse ziehen kann.

Ob die spontane Häufigkeit von ND für alle Säuger unter 1 % liegt, kann hier nicht beurteilt werden. Für die Labor-Kleinsäuger Maus, Goldhamster und chinesischer Hamster trifft das, wie schon erwähnt, zu. Ob das aber auch für Groß-Säuger - wie den Menschen - gilt und die von Scott und Long (46) für das Pferd genannte Häufigkeit von 1,7 % nur ein Ausreißer ist, oder ob Groß-Säuger wirklich eine höhere Spontanhäufigkeit von ND haben, bleibt offen.

#### 4.1.3 Diskussion verschiedener Mutagene (eigene und Literaturdaten)

##### 4.1.3.1 Cyclophosphamid (= Endoxan)

Cyclophosphamid ist eine alkylierende Substanz, die erst nach Aktivierung durch den Stoffwechsel chromosomale Schäden induziert. Röhrborn zeigte, daß die mutagene Wirkung von Cyclophosphamid bei *Drosophila* zu rezessiv geschlechtsgebundenen Letalmutationen führt, ebenfalls zeigte Brittinger, daß Cyclophosphamid bei der Maus dominante Letalmutationen auslöst (52). Die chromosomenbrechende Wirkung von Cyclophosphamid wurde zygotenisch von Schmid und Staiger (53) am Knochenmark des chinesischen Hamsters und von Schleiermacher (54) in der Spermatogenese der Maus gezeigt.

Cyclophosphamid wurde für die Versuche ausgewählt, um einen Vergleichsmaßstab zu den publizierten Daten von Röhrborn und Hansmann zu gewinnen. Röhrborn und Hansmann (13) fanden im Oozytentest eine Steigerung der ND-Spontanrate an C3H-Mäusen auf 4/41 gegenüber 1/95. Bei dem eigenen Versuch, dieses Ergebnis zu reproduzieren, fand sich allerdings weder bei C3H noch bei  $F_1$ -Mäusen eine signifikante Erhöhung der ND-Rate (5/537 gegenüber 4/535 bei C3H bzw. 1/627 gegenüber 0/651 bei  $F_1$ -Mäusen). Danach hat also Cyclophosphamid allenfalls eine schwache ND-auslösende Wirkung. Jedoch wurden mit Cyclophosphamid-Behandlung einige Metaphasen mit einem zusätzlichen oder fehlenden Chromatid oder Chromosomenstück gefunden (3/537 gegenüber 1/535 bei C3H bzw. 1/627 gegenüber 0/651 bei  $F_1$ -Mäusen).

Da die von Röhrborn und Hansmann benutzte Auswertung der Chromatidenzahl, deren Problematik bereits diskutiert wurde, keine sichere Unterscheidung von Chromosomen, Chromatiden und Bruchstücken erlaubt, könnte die chromosomenbrechende Wirkung von Cyclophosphamid ein Grund für die Diskrepanz zwischen den hier gefundenen Ergebnissen und denen von Röhrborn und Hansmann sein.

Alle weiteren Substanzen wurden nur noch an  $F_1$ -Hybriden geprüft, da diese einerseits wegen ihrer Heterozygotie der menschlichen Population näher liegen würden und die erzielten Ergebnisse so auf den Menschen wohl eher übertragbar sind als Ergebnisse an vollständig homozygoten Inzuchtstämmen, und da andererseits deren niedrigere ND-Spontanrate ein statistisch leichter abzusicherndes Ergebnis erwarten läßt.

#### 4.1.3.2 para-Fluor-Phenylalanin (p-FPA)

Die Begründung für die Auswahl dieser und der folgenden Substanzen wurde schon in der Einleitung gegeben.

p-Fluor-Phenylalanin löst bei dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* meiotische ND aus (10). Auch Griffiths und Delange (55) haben in den Versuchen mit p-FPA bei *Neurospora* eine sechsfache Steigerung der meiotischen ND gegenüber den Kontrollen gefunden. Bond und McMillan zeigten eine dosisabhängige Wirkung von p-FPA bei *Sordaria brevicollis* (Ascomycet) und Tate fand durch p-FPA-Behandlung eine Erhöhung von diploiden Spermatiden bei der Wühlmaus *Microtus oeconomus* (zahlenmäßige Daten werden nicht angegeben) (56). Behandlung von HeLa-Zellen mit p-FPA führt zu einer Verlängerung der Metaphasedauer und induziert manche Instabilität und strukturelle Abnormalitäten bei der mitotischen Spindel (57). In menschlichen Amnion-Zellkulturen bewirkt p-FPA eine Verlangsamung der Chromosomenbewegung in der Anaphase (58).

Eigene Ergebnisse mit p-FPA im Oozytentest zeigen keine ND-auslösende, aber eine mögliche chromosomenbrechende Wirkung. Es wurde auch keine Dosisabhängigkeit festgestellt. Sowohl mit der Dosis von 300 mg/kg als auch 500 mg/kg wurden keine Hyperhaploidien gefunden. Nur mit der Dosis von 500 mg/kg wurde eine Metaphase mit 20 Chromosomen + 1 Stück von 403 auswertbaren Oozyten gefunden.

#### 4.1.3.3 Sulfacetamid

Sulfacetamid löst bei *Saccharomyces cerevisiae* (10) mitotische und bei *Neurospora* (56) meiotische ND aus. Auch in eigenen Ergebnissen wurde die ND-auslösende Wirkung von Sulfacetamid festgestellt (2/574). Es wurde keine chromosomenbrechende Wirkung von Sulfacetamid gefunden.

#### 4.1.3.4 Aminopterin

Auch Aminopterin löst bei *Saccharomyces cerevisiae* (10) mitotische ND aus. Im Oozytentest zeigte sich mit der Dosis 100 mg/kg keine, und mit der Dosis 200 mg/kg wohl eine leichte chromosomenbrechende Wirkung (1/573).

#### 4.1.3.5 Trimethoprim

Ebenfalls löst Trimethoprim bei *Saccharomyces cerevisiae* (10) mitotische, bei *Neurospora* (56) meiotische ND aus. Im Oozytentest hatte es keine ND-auslösende, aber vermutlich eine sehr geringe chromosomenbrechende Wirkung (1/561).

Eine andere Klasse von Stoffen, die in dieser Arbeit auf ihre möglichen Wirkungen zur ND-Auslösung untersucht wurden, waren, wie schon in der Einleitung erwähnt, Arzneimittel. Bignami et al. (11) haben 110 pharmazeutische Präparate bei *Aspergillus nidulans* auf mitotische ND und Crossingover getestet. Von diesen Präparaten waren 13 stark aktiv. 4 der aktivsten 13 Präparate wurden ausgewählt und auf meiotische ND an MII-Oozyten der Maus untersucht. Die vier Präparate, die bei *Aspergillus nidulans* mit einem mehr qualitativen als quantitativen Verfahren stark mutagene Wirkungen hatten, waren: Esidrix, Kelfizin, Nitrofurantoin und Entero-Vioform.

#### 4.1.3.6 Esidrix

Es wurde keine ND-auslösende Wirkung von Esidrix im Oozytentest festgestellt, obwohl diese Substanz bei Aspergillus sehr stark mutagen war.

#### 4.1.3.7 Kelfizin

Kelfizin löste bei Aspergillus verstärkt Crossingover aus. Im Oozytentest wurde mit Kelfizin-Behandlung keine ND gefunden, wohl aber eine Metaphase mit Chromatid-Deletion (1/547) beobachtet. Bemerkenswert war in den Kelfizin-Versuchen jedoch, daß mehrere Oozyten im Vergleich zu den Kontrollen zu dem Zeitpunkt der Ovulation, wo sie normalerweise im MII-Stadium sein müßten, im MI-Stadium geblieben waren. Daher scheint Kelfizin in höheren Dosen (höher als 1000 mg/kg) die Eientwicklung zu verzögern und den Eisprung zu hemmen. In höheren Dosen ist Kelfizin für die Maus sehr giftig.

#### 4.1.3.8 Nitrofurantoin

Außer bei Aspergillus nidulans ist Nitrofurantoin auch im Ames-Test aktiv (59), während es weder im Mikrokern-Test (59) noch im Spermatozyten-Test bei der Maus (60) Chromosomenaberrationen induziert. Weitere Untersuchungen mit ebenfalls negativem Ergebnis wurden von Wild (61) aufgeführt.

Die eigenen Ergebnisse zeigen die starke Toxizität von Nitrofurantoin, doch löste es weder strukturelle noch numerische Aberrationen aus.

#### 4.1.3.9 Entero-Vioform

Entero-Vioform zeigte im Oozyten-Test wohl eine leichte chromosomenbrechende Wirkung (1/426), löste aber keine ND aus. Jedoch ist diese Substanz in höheren Dosen (höher als 300 mg/kg) für die Maus giftig.

#### 4.1.3.10 ortho-Phenylendiamin (o-PDA)

Wild et al. (12) haben die mutagene Wirkung von o-PDA im Mikrokern-Test an NMRI-Mäusen, chinesischen Hamstern und Albino-Meerschweinchen untersucht und festgestellt, daß o-PDA im Knochenmark dieser drei Spezies Mikrokerne auslöst.

Eigene Ergebnisse mit o-PDA zeigen, daß diese Substanz auch im Oozyten-Test meßbar aktiv ist und zwar Chromosomenbrüche erzeugt (2/224), nicht aber ND.

#### 4.1.3.11 Colchicin

Das Spindelgift Colchicin führt bei Mikrosporozyten von Lilium in der ersten meiotischen Teilung zu reduzierter Chiasmahäufigkeit und zum Vorkommen von Univalenten (62). Colchicin erzeugt auch Endoreduplikation in Zellkulturen des chinesischen Hamsters, wenn die Zellen zum Zeitpunkt der Colchicin-Behandlung in der späten S-Phase, besonders aber in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus sind (63).

Die mit Colchicin eng verwandte Substanz Colcemid löst in Zellkulturen des chinesischen Hamsters mitotische (64,65) und bei Drosophila meiotische ND (66) aus.

Wie die eigenen Ergebnisse an MII-Oozyten zeigen, war Colchicin die weitaus wirksamste aller getesteten Substanzen. Mit der Dosis von 0,3 mg/kg hatten insgesamt 31 (~ 20 %) von 156 auswertbaren MII-Oozyten einen abweichenden Chromosomensatz. Damit hat sich Colchicin als äußerst starker ND-Auslöser im Oozyten-Test erwiesen.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse an Mäuseembryonen

### 4.2.1 Kriterien zur Auswertung

Im Gegensatz zu MII-Oozyten kann man an Embryonen auch Hypoploidien mit Sicherheit auswerten, wenn mehrere Zellen zum Vergleich zur Verfügung stehen. Gefahr besteht erst dann, wenn nur eine hypodiploide Metaphase auswertbar ist, weil man in diesem Fall nicht mit Sicherheit beurteilen kann, ob diese Metaphase nicht durch einen Präparationsfehler entstanden ist. Diese Gefahr sollte in Kontroll- und Testversuchen berücksichtigt und Embryonen mit nur einer hypodiploiden Metaphase nicht ausgewertet werden.

### 4.2.2 Spontane Häufigkeit der Aneuploidien in Embryonalstadien der Maus

Die spontane Häufigkeit der Aneuploidien in Embryonalstadien der Maus wurde von verschiedenen Autoren in verschiedenen Entwicklungsstadien (Pronukleus bis 14. Tag Foetus) bei verschiedenen Mäusestämmen bestimmt: Hansmann (1973) (67), Röhrborn et al. (1971) (68), Hansmann und Röhrborn (1973) (69), Turan (1976) (70), Szemere und Chandley (1975) (44), Hansmann et al. (1979) (71), Max (1977) (72), Strausmanis et al. (1978) (73) und Basler et al. (1976) (74) (Details siehe Tab. 24).

Wie die Tabelle 24 zeigt, werden für die verschiedenen Embryonalstadien sehr unterschiedliche ND-Spontanwerte gefunden. Diese Unterschiede können erklärt werden durch:

#### 1. Stammesunterschiede

Wie schon an MII-Oozyten festgestellt, hat der genetische Hintergrund der Mäusestämme auf die Induktion von Aneuploidien einen Einfluß. Das gleiche gilt auch für die Embryonalstadien. In der eigenen Diplomarbeit (70) wurde die spontane Häufigkeit für die Aneuploidien in den Entwicklungsstadien 3-Zell- bis Blastocysten-Stadium bei C3H-Mäusen als 2,5 % (8/315), in der vorliegenden Arbeit im Pronukleus - Blastocysten-Stadium bei (C3H x C57Bl)F<sub>1</sub>-Mäusen als < 2 % (0/60) gefunden.

Tab. 24

Spontane Häufigkeit der Aneuploidien in verschiedenen Embryonalstadien der Maus

| Autor, Jahr                  | Mäusestamm         | Hormone<br>[I.E.] |     | Alter d. Mäuse<br>[Wochen] | Zellstadium<br>bzw.<br>Foetalalter | Hypo+Hyperdipl. | Aneupl.<br>[%] |
|------------------------------|--------------------|-------------------|-----|----------------------------|------------------------------------|-----------------|----------------|
|                              |                    | PMS               | HCG |                            |                                    | Auswertbare     |                |
| Hansmann, 1973               | C3H                | 1,5               | 2   | 10-12                      | Pronukleus                         | (3+2) / 32      | 16             |
| Röhrborn<br>et al., 1971     | C3H                | 1,5               | 2   | 10-12                      | 2-Zell.                            | (6)* / 26       | 23             |
|                              | (101xC3H)F1        | 1,5               | 2   | 10-12                      | 2-Zell.                            | (5)* / 24       | 21             |
| Hansmann, 1973               | C3H                | 1,5               | 2   | 10-12                      | 2-Zell.                            | (3+1) / 21      | 19             |
|                              |                    |                   |     |                            | Morula                             | 0 / 10          | <10            |
| Hansmann &<br>Röhrborn, 1973 | (101xC3H)F1        | 1,5               | 2   | 10-12                      | Morula                             | (7+0) / 28      | 25             |
| Turan, 1976                  | C3H                | -                 | -   | 8-12                       | 3-Zell. bis<br>Blastocyste         | (3+5) / 315     | 2,5            |
| Ergebnis<br>dieser Arbeit    | (C3H x<br>C57B1)F1 | 2                 | 2   | 12-24                      | Pronukl. bis<br>Blastocyste        | 0 / 60          | <2             |
| Szemere &<br>Chandley, 1975  | random<br>bred Q   | -                 | -   | 10-12                      | 9 Tage                             | 0 / 64          | <2             |
| Hansmann<br>et al., 1979     | NMRI               | -                 | -   | 8-14                       | 9,5 Tage                           | 0 / 211         | <0,5           |
| Max, 1977                    | CBA                | -                 | -   | 24                         | 10 Tage                            | 0 / 108         | <1             |
|                              |                    |                   |     | 32-35                      | 10 Tage                            | 0 / 78          | <1             |
|                              |                    |                   |     | 45-47                      | 10 Tage                            | (0+2) / 27      | 7,4            |
| Strausmanis<br>et al., 1978  | C57B1              | -                 | -   | 44                         | 10,5 Tage                          | (1+0) / 443     | 0,2            |
| Basler<br>et al., 1976       | NMRI               | 1,5               | 2   | 8-12                       | 9,5 bis<br>13,5 Tage               | 0 / 106         | <1             |

\* Nicht nach Hypo- und Hyperdiploidie aufgeschlüsselt.

## 2. Hormone

Die zur Stimulation der Ovulation benutzten Hormone PMS und HCG könnten den Anteil der Aneuploidien in den Embryonalstadien beeinflussen. Ein Hormoneinfluß auf den Anteil der Aneuploidien in MII-Oozyten wurde, wie schon erwähnt, sowohl mit niedrigen Dosen (2 I.E. PMS, 2 I.E. HCG) in dieser Arbeit als auch mit niedrigen (1,5 I.E. PMS, 1 I.E. HCG) und mit höheren (10 I.E. PMS, 10 I.E. HCG) Dosen in der Arbeit von Hansmann und El-Nahass (39) nicht festgestellt. In den Kontrollversuchen der vorgelegten Arbeit wurden mit den Hormon-Dosen 2 I.E. PMS und 2 I.E. HCG keine Chromosomenaberrationen (0/60) an Embryonen gefunden. Die eigene Diplomarbeit (70) zeigte jedoch, daß höhere Dosen (10 I.E. PMS, 10 I.E. HCG) von Hormonen bei C3H-Mäusen zu einer Erhöhung an Triploidien führen (6/315 in der Kontrolle, 5/45 in den Versuchen).

Boué und Boué (75) fanden unter Spontanaborten von Frauen, die vor der Befruchtung entweder mit HMG (human menopausal gonadotrophin) und HCG oder mit clomiphene citrate und HCG oder nur mit HCG behandelt wurden, eine höhere Rate an Trisomien und Triploidien als unter Spontanaborten von nicht behandelten Frauen (die Dosis der Hormone wird nicht angegeben).

Anscheinend beeinflussen weder niedrige noch höhere Dosen von Hormonen die Spontanrate der Aneuploidien in den MII-Oozyten, die höheren Dosen von Hormonen haben jedoch einen Einfluß auf die spontane Häufigkeit der Aneuploidien und besonders der Triploidien in den Embryonen. Hierbei ist die Frage offen, ob die Hormone, wenn überhaupt, Aberrationen induzieren oder ob durch die Hormone schon vorher defekte Eier zur Ovulation kommen, die ohne Hormone nicht ovulieren würden.

Jedenfalls spielen niedrige Dosen von Hormonen PMS und HCG, wie in der Kontrolle dieser Arbeit zu sehen ist, bei der Erhöhung der Spontanhäufigkeit von ND in den Embryonen keine beachtenswerte Rolle.

## 3. Alter der Mäuse

Wie bei den MII-Oozyten nehmen die Chromosomenaberrationen mit fortschreitendem Alter des Weibchens auch in den Embryonalstadien

zu.

Max (72) fand an 10-Tage-alten Foeten von 24 Wochen alten CBA-Mäuseweibchen 0/108 Aneuploidien, an gleich alten Foeten von 45 - 47 Wochen alten CBA-Weibchen aber 2/27 (ca. 7 %).

Beim Menschen fanden Yamamoto et al. (76) in 500 induzierten Aborten (5. - 12. Schwangerschaftswoche) 34 Fälle (6,8 %) mit Chromosomenanomalien. Materialien wurden von Frauen gewonnen, die ihre Schwangerschaften aus sozioökonomischen Gründen abbrechen wollten. Es wurde ein erhöhtes Vorkommen von Chromosomenanomalien mit zunehmendem Alter der Mutter festgestellt. Das Vorkommen aller Typen von Chromosomenanomalien stieg bei den Frauen von 10/186 (ca. 5 %) im Alter von weniger als 24 Jahren auf 6/25 (24 %) im Alter von über 40 Jahren.

Ebenfalls fanden Sachs et al. (77) von 229 Schwangerschaften in der 15. - 16. Woche 16 (7 %) abnormale Foeten. Es wurde von den schwangeren Frauen etwas Amnion-Flüssigkeit gewonnen und kultiviert. 15 von diesen abnormalen Foeten waren Trisomien, davon 13 Trisomie 21. Chromosomenanomalien waren bei den Frauen von 5/99 (5 %) im Alter von 38 - 40 Jahren auf 6/27 (ca. 20 %) im Alter von 44-46 Jahren gestiegen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuseweibchen waren 3 - 6 Monate alt und werden zu den jüngeren Mäusen gezählt. Tatsächlich wurden in der Kontrolle auch keine Aberrationen gefunden.

#### 4. Alter der Embryonen

Wie die Tabelle 24 zeigt, nimmt bei der Maus der Anteil an Aneuploidien mit fortschreitendem Embryonalstadium stark ab. Das heißt, daß die abnormalen Embryonen in utero mit fortschreitender Entwicklung absterben und degenerieren. Der ND-Anteil von Embryonen ist daher stadienabhängig (intrauterine Selektion) und liegt für spätere Stadien (10. - 14. Tag Foetus) unter 1 %. Aber auch diese sterben noch bis zur Geburt praktisch alle ab (95).

Eine ähnliche Selektion in utero ist auch beim Menschen beobachtbar. Bei Spontanaborten fanden Boué und Boué (75) im ersten

Trimester (1. - 3. Monat) 42 % (575/1374), Dhadial et al. (78) im zweiten Trimester (3. - 6. Monat) 18 % (77/423) und Ruzicska und Czeizel (79) im zweiten Trimester 22 % (12/55) aneuploide Chromosomenaberrationen. Der Anteil aneuploider Chromosomenaberrationen bei Neugeborenen ist nach Jacobs (80) 0,34 % (83/24468). Die Häufigkeit aller Chromosomenanomalien in Spontanaborten ist nach Berechnung von Pawlowitzki (81) 44,4 %.

#### 5. Technik der Auswertung

Wie in der Tabelle 24 zu sehen ist, zeigen die Resultate verschiedener Autoren große Differenzen auch bei gleichen Foetalstadien und bei gleichaltrigen Muttermäusen. Die spontane Häufigkeit der Aneuploidien in den eigenen Ergebnissen ist kleiner als 2 %, dagegen variiert der spontane Anteil der Aneuploidien in den Arbeiten der Röhrborn und Hansmann-Gruppe zwischen 16 und 25 %. Da diese Autoren viel mehr Hypodiploidien finden und nicht beschreiben, wieviele Metaphasen pro Embryo analysiert wurden, mag dieser hohe Anteil von Hypodiploidien auf Artefakte zurückzuführen sein. Dieser Punkt wurde schon in 4.2.1 diskutiert.

Die spontane Häufigkeit aneuploider Embryonen wurde auch bei anderen Säugern bestimmt. Binkert und Schmid (82) fanden beim chinesischen Hamster im 4 - 8-Zellstadium 0,9 % (2/226), Yamamoto und Ingalls (83) beim Goldhamster im Blastocystenstadium unter 1 % (0/135).

Zusammenfassend läßt sich hier feststellen, daß die spontane Häufigkeit der Aneuploidien beim Menschen deutlich höher liegt als bei anderen Säugern. Unter Berufung auf Witschi (84) zeigen Binkert und Schmid (82) einen möglichen Grund dafür auf: während bei den meisten Säugern die optimale Befruchtungsfähigkeit von Spermien und Eiern dadurch gesichert wird, daß ein Östrus eine Kopulation nur kurz vor oder kurz nach der Ovulation zuläßt, gibt es beim Menschen keine derartige zeitliche Abstimmung von Ovulation und Kopulation. "Es liegt also nahe, anzunehmen, daß Befruchtungen, an denen entweder gealterte Spermien oder überreife Eier beteiligt sind, für die große Häufigkeit von Ploidieaberrationen oder numerischen Aberrationen in menschlichen Embryonen verant-

wortlich sind, obwohl ein solcher Kausalzusammenhang noch keineswegs bewiesen ist" (82).

#### 4.2.3 Diskussion der Colchicin-Ergebnisse

Zunächst soll die Problematik der in diesen Versuchen notwendigen zweifachen Colchicin-Gabe aufgegriffen werden, bevor die Häufigkeit der aufgetretenen Anomalien und ihre Gegenselection in utero diskutiert wird.

##### 4.2.3.1 Colchicin zum Stoppen der Metaphasen

In dieser Versuchsreihe taucht eine methodische Schwierigkeit dadurch auf, daß Colchicin zweimal appliziert wird: mit der ersten Gabe (niedrig dosiert, "Test-Colchicin") soll ND ausgelöst werden, mit der zweiten Gabe (hoch dosiert, "Stop-Colchicin") werden die Embryonalzellen in der Metaphase angehalten (vgl. Seite 21 ).

Die "Stop-Colchicin"-Behandlung dauerte 3 - 4 Stunden. Um die Ausbeute an Metaphasen zu erhöhen und einen besseren Arbeitszeitplan zu erreichen, wurde die Behandlungsdauer in den späteren Versuchen der Ein-Zellstadien (und nur in den Ein-Zellstadien) jedoch auf 15 Stunden heraufgesetzt.

Dabei stellt sich die Frage, ob die verlängerte "Stop-Colchicin"-Behandlung ihrerseits ND auslöst. Aus dem Vergleich der Ergebnisse von Ein-Zellstadien:

|              |                                                                      |                           |
|--------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Kontrolle A  | (3-stündige "Stop-Colchicin"-Behandlung)                             | 0 Aberrante/7 Embryonen   |
| Kontrolle B  | (15-stündige "Stop-Colchicin"-Behandlung)                            | 0 Aberrante/20 Embryonen  |
| <hr/>        |                                                                      |                           |
| Versuche mit | Colchicin zur ND-Induktion (15-stündige "Stop-Colchicin"-Behandlung) | 31 Aberrante/43 Embryonen |

folgt eindeutig, daß die hohe Rate an Aberrationen nicht auf die verlängerte "Stop-Colchicin"-Behandlung zurückzuführen ist, sondern durch die niedrig dosierte Gabe von "Test-Colchicin" kurz

vor der Ovulation bewirkt wurde.

#### 4.2.3.2 Vorkommende Anomalien

##### Zurückgebliebene Embryonen

In den "Test-Colchicin"-Versuchen wurden einige Embryonen statt wie erwartet im Blastocystenstadium noch im 2-5-Zellstadium gefunden. Solche in der Entwicklung zurückgebliebenen Embryonen wurden in den Kontroll-Versuchen nicht beobachtet. Diese durch die "Test-Colchicin"-Wirkung erzeugten zurückgebliebenen Embryonen wurden, soweit nicht degeneriert, präpariert, hatten aber keine Zelle in der Metaphase. Anscheinend gingen sie langsam zugrunde. Es ist wahrscheinlich, daß solche zurückgebliebenen Embryonen sich nicht weiter entwickeln konnten, vielmehr im Eileiter blieben und nur wenige im zurückgebliebenen Stadium in den Uterus gelangten. Die im Eileiter gebliebenen Embryonen könnten aberrante Embryonen gewesen sein, die dann im Uterus zum Zeitpunkt des Blastocystenstadiums nicht mehr gefunden würden (eine frühzeitige Eliminierung).

##### Haploidien

Es kamen in den "Test-Colchicin"-Versuchen 2 Haploidien mit 20 Chromosomen vor. Eine war im 4-Zellstadium und die andere im 6-Zellstadium. In den Kontrollen wurde keine Haploidie gefunden. Da diese haploiden Embryonen parthenogenetisch wenigstens zwei Teilungen durchlaufen konnten, sollte die Stimulation durch die Hyaluronidase des Akrosoms stattgefunden haben. Das heißt, das Spermium war beteiligt, konnte aber irgendwie nicht in das Ei eindringen.

Darüberhinaus wurden in den "Test-Colchicin"-Versuchen auch 2 Embryonen mit 21 Chromosomen (Hyperhaploidie) im 2-Zellstadium gefunden, denen jeweils offenbar zwei unabhängige Störungen zugrunde lagen: zum einen bewirkte das "Test-Colchicin" eine Fehlverteilung in der Anaphase I oder II, so daß ein Chromosom im Ei geblieben ist, anstatt in den Polkörper zu wandern, zum zweiten wurde das Ei nicht befruchtet, obwohl alle anderen Eier dieser Maus befruchtet waren.

Zur Lebensfähigkeit haploider Embryonen gibt es unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur. Durch die "Test-Colchicin"-Wirkung in dieser Arbeit bei  $F_1$ -Mäusen, ebenso wie in der eigenen Diplomarbeit spontan bei C3H-Mäusen (70) und schließlich in den Untersuchungen von Binkert und Schmid (82) spontan beim chinesischen Hamster konnten die vorkommenden Haploidien nur bis zum 6-Zellstadium gefunden werden. Unter besonderen experimentellen Bedingungen scheinen haploide Embryonen bei der Maus jedoch länger lebensfähig zu sein: die künstlich durch Hyaluronidase stimulierten haploiden Embryonen in vitro bis zum Blastocystenstadium (85), durch elektrischen Schock in vivo stimulierte haploide Embryonen bis zum Morula-Blastocystenstadium bzw. über die Nidation hinaus oder sogar bis zum 8-Somiten-Stadium (86,87,88) und durch chirurgische Entfernung eines Pronukleus nach Reimplantation in ein anderes Weibchen bis zum Morula-Stadium (89).

Außerdem fanden Kaufmann und Sachs (90), daß bei sich parthenogenetisch entwickelnden Embryonen die Hypohaploidien (19 Chromosomen) um das 2-Zellstadium herum in der Entwicklung scheitern, während die Hyperhaploidien (21 Chromosomen) eine ähnliche Entwicklung wie normale Haploidien ( $n = 20$  Chromosomen) bis zum Morula-Stadium haben.

Obwohl Haploidien sogar bis zum 8-Somiten-Stadium am Leben bleiben können, scheinen die meisten sehr viel früher eliminiert zu werden.

### Triploidien

Triploidien können vorkommen, wenn der zweite Polkörper nicht abgeschnürt wird oder ein zweites Spermium in das Ei eindringt. Derartige Aberrationen kommen hauptsächlich vor bei Hormon-Behandlungen (70,75), bei verzögerter Befruchtung (31,91), bei in vitro Befruchtung (92) und bei Substanz-Behandlungen (z.B. mit "Test-Colchicin"-Behandlung in dieser Arbeit und mit Cytochalasin B (93)).

Triploide Embryonen können über die Implantation hinaus überleben. Diese Embryonen sterben dann während der Organogenese. Bei

den Laborsäugetieren sind die Triploidien während der Postimplantationsperiode letal. Bei der Maus leben die triploiden Embryonen bis ca. zum 10. Tag der Trächtigkeit (94).

Bei den "Test-Colchicin"-Versuchen in dieser vorgelegten Arbeit wurden die triploiden oder triploid-ähnlichen (hyper- und hypo-triploiden) Embryonen hauptsächlich in Ein- bis 3-Zellstadien gefunden (vgl. Tab. 19). Bis zum etwa 8-Zellstadium waren fast alle Triploidien ( $3n = 60$  Chromosomen) und triploid-ähnlichen (53 bis 65 Chromosomen) Embryonen eliminiert.

Das Vorkommen von Hypo- und Hypertriploidien zeigt ebenso wie schon die Haploidien und Hyperhaploidien (s.o.), daß das "Test-Colchicin" über zwei verschiedene Mechanismen wirkt; über einen auf die Verteilung von Chromosomen (vermutlich durch Störung von Centromer oder Spindelapparat) und über einen anderen Mechanismus auf die Gesamtentwicklung von Oozyte und/oder Zygote (durch Eingriff in die Befruchtungsmechanik).

Nach dem Eintritt des ersten Spermiums werden normalerweise biochemische Veränderungen in der Zona pellucida hervorgerufen, die die Permeabilität des Eies für ein zweites Spermium verringern. Vermutlich wird die Permeabilität des Eies durch die "Test-Colchicin"-Wirkung so verändert, daß manchmal kein, manchmal mehr als ein Spermium eindringen kann.

#### Monosomien und Trisomien (Non-disjunction)

Nach "Test-Colchicin"-Behandlung traten viele multiple Aberrationen auf, die sich nicht eindeutig als Hypo- oder Hyperploidien erkennen ließen: so könnte man zum Beispiel die 3 gefundenen Embryonen mit 53 Chromosomen (vgl. Tab. 19) deuten als Hyperdiploidie ( $2n + 13$ , entstanden aus einem normalen Spermium und einer Eizelle mit 13 überzähligen Chromosomen) oder als Hypotriploidie ( $3n - 7$ , entstanden durch Doppelbefruchtung einer Eizelle mit 7 fehlenden Chromosomen). Solche Fälle würden sich nur differenzieren lassen, wenn man die väterlichen und mütterlichen Chromosomen unterscheiden könnte. Aufgrund der Analyse eines Embryos im Pronukleusstadium, in der neben dem männlichen Pronukleus mit  $n = 20$  Chromosomen ein

weiblicher Vorkern mit  $n + 6 = 26$  Chromosomen eindeutig identifiziert werden konnte (vgl. Abb. 40), wurde angenommen, daß auch Vielfach-Trisomien durch "Test-Colchicin" induziert wurden. Angenommen, daß ein Embryo mit Metaphasen bis zu 50 Chromosomen (multiple Trisomie) als eine ND gezählt werden darf, stünden den 16 Hypodiploidien (mit  $2n - 1$  bis  $2n - 3$  Chromosomen) insgesamt 25 Hyperdiploidien gegenüber. Aberrationen, die nur ein Chromosom betreffen, sind allerdings gleich häufig: 11 Monosomien ( $2n - 1$ ) bzw. 12 Trisomien ( $2n + 1$ ).

Auch die vorkommenden Monosomien und Trisomien waren bis zum Blastocystenstadium merklich reduziert.

Gropp et al. (95) fanden durch experimentelle Induktion der Trisomien bei der Maus, daß alle Trisomien unvermeidlich zu frühem oder spätem Tod während der Embryonalentwicklung führen. Monosomische Embryonen werden in einem frühen Stadium der Entwicklung eliminiert. Die meisten aberranten Embryonen, die ab dem 8. oder 10. Tag der Trächtigkeit beobachtet wurden, waren trisomische Embryonen. Trisomie 3, 11 und 17 sterben früh in der Entwicklung. Trisomie 1, 4, 10, 13 und 16 können bis zum 13. - 15. Tag der Trächtigkeit überleben, Trisomie 12 sogar bis zum 17. Tag. Trisomie 19 kann bis zum 19,5. Tag der Trächtigkeit überleben und ist immer mit gespaltenem Gaumen assoziiert (96).

#### 4.2.3.3 Selektion in utero

In den Embryonalstadien bis zum 16-Zeller zeigten etwa 3/4 aller auswertbaren Embryonen ( $70/98 = \text{ca. } 71 \%$ ) nach "Test-Colchicin"-Behandlung eine numerische Chromosomenaberration. Der Anteil der Hyperploidien ( $20/98$ ,  $\sim 20 \%$ , gezählt nur die Embryonen mit  $2n + 1$  bis  $2n + 3$  Chromosomen) liegt aber kaum höher als im MII-Stadium ( $24/156 = \text{ca. } 15 \%$ ), so daß sich der starke Anstieg der Aberrationshäufigkeit überwiegend auf fehlerhafte Befruchtung zurückführen läßt (Parthenogenese, Doppelbefruchtung u.a.).

Mit 2/11 bleibt der Anteil der aberranten Blastocysten aber weit hinter den durchschnittlich 70 % der früheren Embryonalstadien zurück. Wenn man diesen Befund nicht als eine bloße Zufalls-

streuung betrachtet, läßt er sich durch intrauterine Selektion gegen präimplantative defekte Embryonen deuten, ähnlich der, die für postimplantative Embryonen bereits beschrieben worden ist (95).

Was geschieht aber mit den ausselektierten aberranten Embryonen? Wie Tabelle 21 zeigt, bleibt die absolute Zahl der Embryonen pro Maus bis zum Blastocystenstadium praktisch gleich, die Embryonen verschwinden also nicht sofort. Andererseits sinkt die Zahl der auswertbaren Embryonen pro Maus von durchschnittlich 3,3 (43/13) im Pronukleusstadium auf 1,4 (11/8) im Blastocystenstadium. Ob sich hinter diesem Schwund tatsächlich ein langsames Degenerieren der aberranten Embryonen (und nicht etwa ein technisch bedingter Unterschied in der Ausbeute) verbirgt, bleibt einer speziellen Analyse dieser Frage mit größerer Statistik überlassen.

#### 4.3 Zusammenfassende Wertung der Ergebnisse

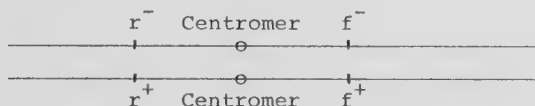
Aufgrund der Kontrolle an F1-Mäusen (0/651) konnte die ND-Spontanrate nur grob geschätzt werden:  $\approx 2 \times 10^{-3}$ . Demgegenüber löste nur eine einzige Substanz, nämlich Colchicin (24/156), zweifelsfrei vermehrt ND aus. Keine der anderen geprüften Substanzen war gegenüber der Kontrolle zweifelsfrei als ND-Auslöser abzusichern.

Obwohl es zunächst widersprüchlich erscheint hilft aber gerade dieses Negativ-Ergebnis bei einer besseren Abschätzung für die Größenordnung der "wirklichen" Spontanrate: Wenn man nämlich alle gefundenen Fälle von ND als spontan entstandene ND ansieht und daher alle Ergebnisse an F1-Mäusen addiert (natürlich ohne die Colchicin-Ergebnisse!), kann man auf dieser Basis eine verbesserte Schätzung für die ND-Spontanrate machen: sie sollte unter 3/6090, d.h. wohl bei  $5 \times 10^{-4}$  oder noch darunter, liegen. Gegenüber dieser Obergrenze der Spontanrate ist nun aber die Erhöhung durch Sulfacetamid (2/574) mit guter Wahrscheinlichkeit signifikant, so daß sich die Schätzung für die spontane ND-Häufigkeit schließlich auf 1/5516 ( $\approx 2 \times 10^{-4}$ ) reduziert.

Für die chromosomenbrechende Wirkung läßt sich nur eine Substanz (o-Phenylendiamin, dessen chromosomenbrechende Wirkung bereits aus dem Mikrokerntest bekannt war) mit 2/224 deutlich von der Kontrolle (0/651) unterscheiden. Mehrere andere Substanzen (nämlich Cyclophosphamid, p-Fluor-Phenylalanin, Aminopterin, Trimethoprim, Kelfizin und Entero-Vioform) könnten zwar auch chromosomenbrechende Wirkung haben, doch sind sie nicht gegenüber der Kontrolle signifikant. Auch wenn man alle Ergebnisse addiert - wie zur Schätzung der ND-Spontanrate -, erhält man für die Spontanrate von Chromosomenbrüchen kein klareres Ergebnis.

Es war ein Ziel dieser Arbeit, zu prüfen, wie gut sich nach ND-Tests an Pilzen das Risiko einer Substanz für den höheren Säuger beurteilen läßt. Dazu muß aber zunächst die Frage diskutiert werden, ob die Pilz-Tests wirklich ND und nicht etwa Doppel-Cross-over oder andere genetische Effekte messen.

Sowohl das von Parry und Zimmermann ausgearbeitete Hefe-Testsystem (97), als auch das von Bignami et al. entwickelte Aspergillus-Testsystem (11) funktionieren nach dem folgenden Prinzip: Für den ND-Test wird jeweils ein diploider Stamm (Pilze sind normalerweise haploid) mit einem mehrfach gekennzeichneten Markerchromosom benutzt, von dem aber nur 2 Marker zur Auswertung verwendet werden. Dieser Ausgangsstamm ist heterozygot für ein Resistenzgen auf dem einen Chromosomenarm, wobei das rezessive Allel ( $r^-$ ) bei Homozygotie oder Hemizygotie die Resistenz bewirkt, und ebenfalls heterozygot für ein Farbggen auf dem anderen Chromosomenarm, dessen rezessives Allel ( $f^-$ ) in cis-Stellung zu  $r^-$  liegt:



Nach dem Ausplattieren auf prüfsubstanzhaltigem Selektionsmedium können nur resistente Kolonien wachsen. Unter diesen wird nach Kolonien gesucht, die auch den rezessiven Farbmarker ausgeprägt haben. Diese können entstanden sein

1. durch ND als Monosomien,
2. durch Deletionen beider dominanter Allele,
3. durch gleichzeitiges mitotisches Crossover im linken und im rechten Arm des Chromosoms (Einfachcrossover lassen sich durch ihre Färbung ( $f^+$ ) klar unterscheiden),
4. durch vollständige Haploidisierung.

Parry und Zimmermann haben für das Hefe-System versucht, die relativen Häufigkeiten von Doppel-Crossovern und monosomischer ND zu ermitteln, indem sie die Ausprägung von weiteren rezessiven cis-Markern untersuchten. An spontan entstandenen und an UV- und  $\gamma$ -Strahlen induzierten Mutanten fanden sie, daß etwa 2/3 der gesuchten Kolonien als Monosomien durch mitotische ND entstanden waren. Eine Messung des DNA-Gehaltes der Zellen zeigte auch, daß die meisten dieser Kolonien nicht durch Rückkehr zur Haploidie, sondern als Monosomien entstanden waren (97).

Die Spontanrate für derartige Monosomien ist ca.  $10^{-6}$ . Mit Sulfacetamid (!) erhöhte sie sich um eine Zehnerpotenz (10). Mit Aminopterin und Trimethoprim wurden ähnliche Erhöhungen der Rate gefunden (unveröffentlichte Arbeit von Sharp und Parry).

Zur Entdeckung disomischer Sporen ( $n+1$ ), die durch meiotische ND erzeugt wurden, wurde ein anderer diploider Hefestamm verwendet. Bei diesem System bewirkte p-Fluor-Phenylalanin eine Erhöhung der ND um das Zwanzigfache (10).

Das Aspergillus-System arbeitet semiquantitativ nach der Methode des Plättchentests, bei der ein mit Prüfsubstanz getränktes Filterpapier auf die auf Selektionsmedium ausplattierten Zellen gelegt wird, so daß durch Diffusion ein Konzentrationsgradient entsteht. Zu den stärksten ND-Auslösern unter 110 geprüften Arzneimitteln gehören Esidrix, Entero-Vioform und Nitrofurantoin. Kelfizin hat die meisten Crossover induziert (11).

Die Autoren dieser Arbeiten kommen daher zu dem Schluß, daß die Substanzen Sulfacetamid, Aminopterin, Trimethoprim und p-Fluor-Phenylalanin bei Hefe und Esidrix, Entero-Vioform und Nitrofurantoin bei Aspergillus die ND-Rate wirklich beträchtlich steigern. Von diesen hatte allenfalls eine, nämlich Sulfacetamid, im MII-Test eine meßbare Aktivität.

Die an Mäusen vermutlich erkennbare chromosomenbrechende Wirkung einiger Substanzen ist mit den Ergebnissen an Pilzen nicht direkt vergleichbar, da Chromosomenstücke dort nicht beobachtbar sind. Andererseits läßt sich die bei Pilzen festgestellte Steigerung der mitotischen Crossoverhäufigkeit durch Kelfizin nicht an den hier untersuchten Mäuse-Oozyten feststellen. Die beiden Effekte mögen aber dieselbe Ursache haben.

Die insgesamt geringe Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen an Pilzen und den hier gewonnenen an der Maus könnte folgende Gründe haben:

- 1) Unterschiede im Stoffwechsel der beiden Spezies  
(Substanzen, die für den einen Organismus als direktes Mutagen wirken, müßten z. B. im Stoffwechsel des anderen erst aktiviert werden. In einem solchen Falle dürfte eine Substanz dann vielleicht nicht erst kurz vor dem MI-Stadium injiziert werden, weil sie dann ihre optimale Wirkung gar nicht erreicht. So könnten Testsubstanzen zu spät appliziert worden sein.)
- 2) Unterschiede in der wirksamen Dosis  
(Für viele Substanzen konnte bei der Maus wegen toxischer Nebenwirkungen eine bestimmte Maximaldosis nicht überschritten werden. Bei einigen schwerlöslichen Substanzen, die in gummi arabicum i.p. appliziert wurden, fanden sich noch 14 Stunden später Reste der Suspension im Bauchraum. So könnte es sein, daß die wirksame Dosis bei der Maus gar nicht erreichbar ist.)
- 3) Membran- oder Gewebeschränken lassen die Substanz vielleicht gar nicht an die meiotischen Zellen gelangen.

Diese Gründe können aber nicht einfach für alle untersuchten Substanzen den Unterschied zwischen den Pilz- und Maus-Ergebnissen erklären, sondern müßten für jede Substanz einzeln genau geprüft werden.

Die geringe Korrelation zwischen den Ergebnissen an Pilzen und Mäusen mag allerdings auch auf einer Schwäche der Pilzarbeiten beruhen: Die für die Feststellung von echter ND sehr wichtige Unterscheidung zwischen Monosomie und Haploidie wurde nur von Parry und Zimmermann, und von diesen auch nur für spontane und strahleninduzierte Mutanten vorgenommen. Es ist jedoch nicht von vornherein auszuschließen, daß viele Substanzen keine Monosomien, sondern nur vollständige Haploidisierung der diploiden Pilzstämmen auslösen (eine Tendenz dazu zeigt sich im DNA-Gehalt der UV-induzierten Mutanten (97)), was die Relevanz der Pilzdaten beträchtlich relativiert. Diese Kritik gilt jedoch nicht für das neuentwickelte Hefesystem (10), in dem auf disomische Sporen selektiert wird.

Ein anderer Grund dafür, daß Substanzen, die bei Pilzen als ND-Auslöser beschrieben wurden, im MII-Test an F1-Mäusen aber keine meßbare ND-Häufigkeit bewirkt haben, könnte sein, daß die Sensitivität des MII-Tests einfach nicht ausreicht, um die Steigerung der ND-Rate nachzuweisen. Daraus, daß die positive Kontrolle mit Colchicin weit über der Nachweisgrenze liegt, kann man nicht folgern, daß die Sensitivität auch für andere Substanzen ausreicht, die die ND-Häufigkeit zwar nicht so stark wie Colchicin, aber immer noch sehr stark erhöhen würden. Colchicin war ja auch in dieser Arbeit noch fast 50 mal so stark wie Sulfacetamid.

Die Sensitivität des Tests ist sehr davon abhängig, wo die "wirkliche" Spontanrate liegt. Da aber für die Spontanrate in dieser Arbeit nur eine obere Grenze gegeben werden konnte, verbleibt eine gewisse Unklarheit darüber, wie groß die Sensitivität des Tests genau ist. Es läßt sich also nicht mit absoluter Sicherheit sagen, ob die an Pilzen vermuteten ND-Auslöser bei der Maus völlig unwirksam sind.

Hätte man sich dann - mindestens im Rückblick - doch besser dafür entscheiden sollen, den MII-Test an C3H- statt an F1-Mäusen durchzuführen, für die die Spontanrate (4/535) selbst schon im Meßbereich liegt? Wenn man erwarten dürfte, daß ND-Auslöser die jeweilige Spontanrate um einen bestimmten Faktor steigern, so wären C3H-Mäuse zweifellos die geeigneteren Versuchstiere. Man muß aber wohl eher damit rechnen, daß eine aktive Substanz unabhängig von der Höhe der Spontanrate eine bestimmte Anzahl von zusätzlichen Schäden setzt, die sich dann zu den spontan entstandenen Fehlern addieren. In diesem Fall wird ein Stamm mit niedrigerer Spontanrate viel leichter eine Aussage über die ND-auslösende Wirkung geprüfter Substanzen erlauben.

Die ND-Spontanrate in C3H-Mäusen ist immerhin 40fach erhöht gegenüber der geschätzten Spontanrate in (C3HxC57B1)F1-Mäusen. Das deutet an, daß dieser Inzuchtstamm einen genetischen Defekt trägt. MII-Tests an diesen Tieren würden also mehr über diesen

Defekt aussagen als über eine ND-auslösende Wirkung der geprüften Substanzen, so daß für den MII-Oozytentest F1-Tiere zweifellos die geeigneteren Versuchstiere sind.

Da eine genaue Kenntnis der Spontanrate im MII-Test noch fehlt, läßt sich auch die Frage nach der Relevanz der Pilzsysteme zur Risikoabschätzung nur vorläufig beantworten. Wenn sich der MII-Test aber für 10fache "Steigerungen der Spontanrate" als hinreichend sensitiv erweisen sollte, müßten 6 der 7 im Pilztest gefundenen ND-Auslöser für die Maus als "Falsch-Positive" gelten. Nur eine Substanz, Sulfacetamid, wäre in beiden Testsystemen überlappend als "positiv" gefunden worden. Gefährlicher als die Falsch-Positiven wären aber die Falsch-Negativen, also Substanzen, die im Pilzsystem keine ND auslösen, wohl aber bei der Maus. Solche Untersuchungen sind aber bisher noch nicht durchgeführt worden.

Aufgrund der hohen Häufigkeit von Non-disjunction beim Menschen, die 3-4 von 1000 Neugeborenen betrifft, scheint es unbedingt nötig zu sein, starke ND-Auslöser zu erkennen, um einer weiteren Erhöhung dieser schwerwiegenden Schäden vorzubeugen. Obwohl in dieser Arbeit die ND-Spontanrate bei F1-Hybridmäusen noch nicht endgültig festgestellt werden konnte, scheint es in naher Zukunft möglich, mit vertretbarem Arbeitsaufwand starke ND-Auslöser in MII-Oozyten der Maus zu erkennen.

## 5. ANHANG:

### EIGNUNG DES MII-OOZYTENTESTS ALS ROUTINE-PRÜFVERFAHREN

Die Non-disjunction ist sicher einer der Aspekte der Mutagenese, der für den Menschen wegen der Häufigkeit und Schwere der Schäden die größte Bedeutung haben. Zur Abwehr solcher Gefahren wäre auch der Einsatz beträchtlicher Mittel gerechtfertigt.

Im Vergleich zu den Tests an niederen Eukaryonten läßt der Oozytentest als in-vivo-Säugertest eine hohe Übertragbarkeit seiner Ergebnisse auf den Menschen erwarten und damit eine bessere Risikoabschätzung. Falls sich darüberhinaus die geringe Überlappung zwischen Pilz und Maus bestätigen sollte, wie sie sich in dieser Arbeit andeutet, wäre der Einsatz des aussagekräftigen Säuger-Tests umso nötiger.

Geht man davon aus, daß etwa 500 MII-Oozyten pro Substanz geprüft werden müssen, um sicherzustellen, daß starke ND-Auslöser nicht unerkannt bleiben, so müssen ca. 700-1000 Eier präpariert und dafür etwa 80-100 Mäuseweibchen geopfert werden.

Die Kosten für die Laborausrüstung (Stereo-Mikroskop, Lichtmikroskop u.a.) und für die eingesetzten Verbrauchsmaterialien (Hormone, Chemikalien, Objektträger, Präparatekästen u.a.) werden einschließlich des Preises für Mäuse 1/3 der aufzuwendenden Gesamtkosten kaum übersteigen.

Der erforderliche Aufwand an Arbeit und Zeit ist aber in diesem Testsystem sehr hoch. Die Arbeitskapazität ist in erster Linie dadurch begrenzt, daß das Platzen der Eier nach der hypotonen Behandlung bei jedem Ei einzeln sorgfältig überwacht werden muß. Hinzu kommt, daß nur relativ wenige Eier (nicht mehr als 6) gemeinsam vor dem einzelnen Fixieren 9-16 Minuten hypoton behandelt werden dürfen, erst dann die nächste Reihe. (Es ist nicht empfehlenswert, wie manche Wissenschaftler bevorzugen, alle Mäuse gleichzeitig zu töten und alle gewonnenen Eier gemeinsam auf einmal hypoton zu behandeln, weil sich dadurch die

Ausbeute an auswertbaren Oozyten reduziert und außerdem so mehr Artefakte entstehen, z. B. in Chromatiden gespaltene Chromosomen.)

Da die Eier sich aber auch nur etwa 4 Stunden lang im präparierbaren MII-Stadium befinden (in der sich anschließenden Anaphase II sind die Chromosomen meist nicht mehr deutlich sichtbar, so daß die Ausbeute an auswertbaren Eiern rasch abnimmt), kann eine Person innerhalb dieses Zeitraumes bis zu 100 Oozyten präparieren. Wenn dieselbe Person allerdings auch die Mäuseweibchen tötet und die Oozyten herausgewinnt, reduziert sich diese Zahl auf etwa 50-60 Oozyten (von 6 Mäuseweibchen) pro Präparationsperiode. Ebenfalls etwa 4 Stunden werden benötigt, um diese 60 Präparate zu färben, auszuwerten und zu protokollieren.

Eine wesentliche Schwierigkeit tritt besonders durch die Gesamtversuchsdauer von 4 Tagen auf. Zwar ist nur der 4. Tag jeweils ganz durch Präparieren und Auswerten ausgefüllt, doch ist es unerläßlich, daß die anderen Arbeitsschritte (Injektion von PMS am 1. Tag, Injektion von HCG am 3. Tag und Injektion der Prüfsubstanz 2-3 Stunden nach HCG-Gabe) im richtigen zeitlichen Abstand vor dem Gewinnen der Oozyten vorgenommen werden. Wenn im Routinetest am Wochenende nicht einmal die wenig zeitaufwendige Hormon-Injektion vorgenommen werden kann, bleiben pro Woche nur Donnerstag und Freitag als Präparationstage. Die Färbung und Auswertung der Präparate müssen nicht unmittelbar nach der Präparation erfolgen, so könnte die bei 100-120 Oozyten pro Woche anfallende Arbeit innerhalb einer Halbtagsarbeit erledigt oder von einer Person übernommen werden, die während der ersten Wochenhälfte einen anderen Routinetest betreut.

In dieser Arbeit wurden die Hormone jeweils um 17 Uhr abends, die Prüfsubstanz um 19 bis 20 Uhr abends injiziert, da die Oozyten dann immer vormittags präpariert werden konnten. Es wurde nicht geprüft, wie weit man die Hormongaben vorverlegen

kann, ohne gleichzeitig entsprechend früher mit dem Präparieren zu beginnen bzw. eine niedrigere Ausbeute in Kauf nehmen zu müssen. Falls es gelingt, diese Arbeitsschritte in die reguläre Arbeitszeit einzugliedern, ergibt sich als Aufwand für jede zu prüfende Substanz:

|                                           |       |           |
|-------------------------------------------|-------|-----------|
| 100 Mäuseweibchen à 10,- DM               | ..... | 1000,- DM |
| Verbrauchsmaterial                        | ..... | 1000,- DM |
| (Hormone, Chemikalien, Objektträger u.a.) |       |           |
| Personalkosten                            | ..... | 7500,- DM |
| (ca. 3 Monate, halbtags)                  |       |           |

---

insgesamt ca. 9500,- DM

An eine Automatisierung des Verfahrens, die aber höchstens die Auswertung der Präparate betreffen könnte, könnte vermutlich nur zum Vorsortieren der Präparate gedacht werden.

## 6. LITERATUR

- (1) Standardlehrbücher der Genetik, besonders:  
Rieger, R. und Michaelis, A.: Die Chromosomenmutationen.  
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1967).
- (2) Wild, D. und Harnasch, D.: Mutagenitäts-Prüfung, ein Frühwarnsystem gegen Erbschäden und Krebs?  
Umschau 80, Heft 22, 682-687 (1980).
- (3) Sankaranarayanan, K.: The role of non-disjunction in aneuploidy in man. An overview.  
Mut. Res. 61, 1-28 (1979).
- (4) Wolf, U. und Engel, W.: Gene activation during early development of mammals.  
Humangenetik 15, 99-118 (1972).
- (5) Fialkow, P.J.: Thyroid antibodies, Down's syndrome, and maternal age.  
Nature 214, 1253-1254 (1967).
- (6) Langenbeck, U., Hansmann, I., Hinney, B. und Hönig, V.: On the origin of the supernumerary chromosome in autosomal trisomies - with special reference to Down's syndrome.  
Hum. Genet. 33, 89-102 (1976).
- (7) Niikawa, N., Merotto, E. und Kajii, T.: Origin of acrocentric trisomies in spontaneous abortuses.  
Hum. Genet. 40, 73-78 (1977).
- (8) Licznarski, G. und Lindsten, J.: Trisomy 21 in man due to maternal non-disjunction during the first meiotic division.  
Hereditas 70, 153-154 (1972).
- (9) Robinson, J.A.: Meiosis I non-disjunction as the main cause of trisomy 21.  
Hum. Genet. 39, 27-30 (1977).
- (10) Parry, J.M.: The detection of chromosome non-disjunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in: Scott, D., Bridges, B.A. und Sobels, F.H. (Hrsg.): Progress in Genetic Toxicology. Elsevier/North Holland Biomedical Press (1977).
- (11) Bignami, M., Morpurgo, G., Pagliani, R., Carere, A., Conti, G. und Giuseppe, G.D.: Non-disjunction and crossing-over induced by pharmaceutical drugs in *Aspergillus nidulans*.  
Mut. Res. 26, 159-170 (1974).
- (12) Wild, D., King, M.-T. und Eckhardt, K.: Cytogenetic effect of ortho-phenylenediamine in the mouse, Chinese hamster, and Guinea pig and of derivatives, evaluated by the micronucleus test.  
Arch. Toxicol. 43, 249-255 (1980).

- (13) Röhrborn, G. und Hansmann, I.: Induced chromosome aberrations in unfertilized oocytes of mice.  
Humangenetik 13, 184-198 (1971).
- (14) von Faber, H. und Haid, H.: Endokrinologie.  
UTB 110, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart (1972).
- (15) Jung, S.: Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1962).
- (16) Hagemann, E. und Schmidt, G.: Ratte und Maus, Versuchstiere in der Forschung.  
Walter de Gruyter & Co., Berlin (1960).
- (17) Roberts Rugh: The mouse, its reproduction and development.  
Burgess Publishing Company (1968).
- (18) Kuhlmann, W.: Cytology and timing of meiotic stages in female germ cells of mammals and man. In: Vogel, F. und Röhrborn, G. (Hrsg.): Chemical mutagenesis in mammals and man.  
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1970).
- (19) Borum, K.: Oogenesis in the mouse, a study of the meiotic prophase.  
Exp. Cell Res. 24, 495-507 (1961).
- (20) Crone, M., Levy, E. und Peters, H.: The duration of the pre-meiotic DNA synthesis in mouse oocytes.  
Exp. Cell Res. 39, 678-688 (1965).
- (21) Oakberg, E. F.: Relationship between stage of follicular development and RNA synthesis in the mouse oocyte.  
Mut. Res. 6, 155-165 (1968).
- (22) Bresch, C. und Hausmann, R.: Klassische und molekulare Genetik.  
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1972).
- (23) Borum, K.: Oogenesis in the mouse, a study of the origin of the mature ova.  
Exp. Cell Res. 45, 39-47 (1966).
- (24) Sirlin, J. L. und Edwards, R. G.: Timing of DNA synthesis in ovarian oocyte nuclei and pronuclei of the mouse.  
Exp. Cell Res. 18, 190-194 (1959).
- (25) Röhrborn, G.: The activity of alkylating agents, I. Sensitive mutable stages in spermatogenesis and oogenesis, in: Vogel, F. und Röhrborn, G. (Hrsg.): Chemical Mutagenesis in Mammals and Man.  
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1970).

- (26) van der Gulden, W.J.I., van Hooijdonk, C.L., de Jong, P. und Kremer, A.K. (Hrsg.): Versuchstiere und Versuchstier-technik. Band I. Veröffentlichungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde, Basel (1975).
- (27) Lipkow, J.: Die Begattung bei der weißen Maus. Z. Tierpsych. 17, 182-187 (1960).
- (28) Rafferty, K.A.: Methods in experimental embryology of the mouse. The Johns Hopkins Press, Baltimore London (1970).
- (29) Taylor, B.A.: Genetic relationships between inbred strains of mice. J. of Hered. 63, 83-86 (1972).
- (30) Staats, J.: Standardized nomenclature for inbred strains of mice. Fifth listing. Cancer Res. 32, 1609-1646 (1972).
- (31) Vickers, A.D.: Delayed fertilization and the prenatal sex-ratio of the mouse. J. Reprod. Fert. 20, 63-68 (1969), und: Delayed fertilization and chromosomal anomalies in mouse embryos. J. Reprod. Fert. 20, 69-76 (1969).
- (32) Tarkowski, A.K.: An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. Cytogenetics 5, 394-400 (1966).
- (33) Gates, A.H.: Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In: Daniel, J.C. (Hrsg.): Methods in mammalian embryology. W.H. Freeman and Co., San Francisco (1971).
- (34) The Merck Index, an encyclopedia of chemicals and drugs. Ninth edition. Merck & Co., Rahway, N.J., U.S.A. (1976).
- (35) Edwards, R.G. und Searle, A.G.: Genetic radiosensitivity of specific post-dictyate stages in mouse oocytes. Genet. Res. (Camb.) 4, 389-398 (1963).
- (36) Index Merck. Neunte Auflage. E. Merck AG, Darmstadt (1961).
- (37) Röhrborn, G. und Hansmann, I.: Oral contraceptives and chromosome segregation in oocytes of mice. Mut. Res. 26, 535-544 (1974).
- (38) Hansmann, I.: Chromosome aberrations in metaphase II-oocytes, stage sensitivity in the mouse oogenesis to amethopterin and cyclophosphamide. Mut. Res. 22, 175-191 (1974).

- (39) Hansmann, I. und El-Nahass, E.: Incidence of nondisjunction in mouse oocytes.  
Cytogenet. Cell Genet. 24, 115-121 (1979).
- (40) Uchida, I.A. und Lee, C.P.V.: Radiation-induced nondisjunction in mouse oocytes.  
Nature 250, 601-602 (1974).
- (41) Shimada, T., Watanabe, T. und Endo, A.: Potential mutagenicity of cadmium in mammalian oocytes.  
Mut. Res. 40, 389-396 (1976).
- (42) Martin, R.H., Dill, F.J. und Miller, J.R.: Nondisjunction in aging female mice.  
Cytogenet. Cell Genet. 17, 150-160 (1976).
- (43) Reichert, W., Hansmann, I. und Röhrborn, G.: Chromosome anomalies in mouse oocytes after irradiation.  
Humangenetik 28, 25-38 (1975).
- (44) Szmere, G. und Chandley, A.C.: Trisomy and triploidy induced by X-irradiation of mouse spermatocytes.  
Mut. Res. 33, 229-238 (1975).
- (45) Beatty, R.A., Lim, M.-C. und Coulter, V.J.: A quantitative study of the second meiotic metaphase in male mice (*Mus musculus*).  
Cytogenet. Cell Genet. 15, 256-275 (1975).
- (46) Scott, I.S. und Long, S.E.: An examination of chromosomes in the stallion (*Equus caballus*) during meiosis.  
Cytogenet. Cell Genet. 26, 7-13 (1980).
- (47) Watanabe, T., Shimada, T. und Endo, A.: Mutagenic effects of cadmium on mammalian oocyte chromosomes.  
Mut. Res. 67, 349-356 (1979).
- (48) Hansmann, I., Neher, J. und Röhrborn, G.: Chromosome aberrations in metaphase II oocytes of Chinese hamster (*Cricetus griseus*). I. The sensitivity of the pre-ovulatory phase to triaziquone.  
Mut. Res. 25, 347-359 (1974).
- (49) Röhrborn, G.: Frequencies of spontaneous non-disjunction in metaphase II oocytes of mice.  
Humangenetik 16, 123-125 (1972).
- (50) Luthard, F.W., Palmer, C.G. und Yu, P.-L.: Chiasma and univalent frequencies in aging female mice.  
Cytogenet. Cell Genet. 12, 68-79 (1973).
- (51) Uchida, I.A. und Freeman, C.P.V.: Radiation-induced nondisjunction in oocytes of aged mice.  
Nature 265, 186-187 (1977).

- (52) Brittinger, D.: Die mutagene Wirkung von Endoxan bei der Maus.  
Humangenetik 3, 156-165 (1966).
- (53) Schmid, W. und Staiger, G.R.: Chromosome studies on bone marrow from Chinese hamsters treated with benzodiazepine tranquilizers and cyclophosphamide.  
Mut. Res. 7, 99-108 (1969).
- (54) Schleiermacher, E.: Über den Einfluß von Trenimon und Endoxan auf die Meiose der männlichen Maus. II. Cytogenetische Befunde nach Behandlung mit Trenimon und Endoxan.  
Humangenetik 3, 134-155 (1966).
- (55) Griffiths, A.J.F. und Delange, A.M.: p-Fluorophenylalanine increases meiotic non-disjunction in a Neurospora test system.  
Mut. Res. 46, 345-354 (1977).
- (56) Zimmermann, F.K., de Serres, F.J. und Shelby, M.D.: Meeting report: Workshop on systems to detect induction of aneuploidy by environmental mutagens. Savannah, Georgia, November 5-8, 1978.  
Mut. Res. 64, 279-285 (1979).
- (57) Siskin, J.E., Stevens, E.E. und Donnelly, G.M.: Effects of p-DL-fluorophenylalanine on mitosis and the mitotic spindle.  
Exp. Cell Res. 73, 25-32 (1972).
- (58) Siskin, J.E.: The effects of p-DL-fluorophenylalanine on chromosome movement and cytokinesis of human amnion cells in culture.  
Chromosoma (Berl.) 44, 91-98 (1973).
- (59) Goodman, D.R., Hakkinen, P.J., Nemenzo, J.H. und Vore, M.: Mutagenic evaluation of nitrofurantoin derivatives in Salmonella typhimurium, by the micronucleus test, and by in vivo cytogenetics.  
Mut. Res. 48, 295-306 (1977).
- (60) Fonatsch, C.: Effect of nitrofurantoin on meiosis of the male mouse.  
Hum. Genet. 39, 345-351 (1977).
- (61) Wild, D.: Mutagene Wirkung von Nitrofurantoin?  
Arznei-Telegramm 12/78 (1978).
- (62) Shepard, J., Boothroyd, E.R. und Stern, H.: The effect of colchicine on synapsis and chiasma formation in microsporocytes of Lilium.  
Chromosoma (Berl.) 44, 423-437 (1974).

- (63) Rizzoni, M. und Palitti, F.: Regulatory mechanism of cell division. I. Colchicine-induced endoreduplication. *Exp. Cell Res.* 77, 450-458 (1973).
- (64) Cox, D.M.: A quantitative analysis of colcemid-induced chromosomal nondisjunction in Chinese hamster cells in vitro. *Cytogenet. Cell Genet.* 12, 165-174 (1973).
- (65) Kato, H. und Yosida, T.H.: Nondisjunction of chromosomes in a synchronized cell population initiated by reversal of colcemid inhibition. *Exp. Cell Res.* 60, 459-464 (1970).
- (66) Traut, H. und Scheid, W.: The induction of aneuploidy by colcemid fed to *Drosophila melanogaster* females. *Mut. Res.* 23, 179-188 (1974).
- (67) Hansmann, I.: Induced chromosomal aberrations in pronuclei, 2-cell stages and morulae of mice. *Mut. Res.* 20, 353-367 (1973).
- (68) Röhrborn, G., Kühn, O., Hansmann, I. und Thon, K.: Induced chromosome aberrations in early embryogenesis of mice. *Humangenetik* 11, 316-322 (1971).
- (69) Hansmann, I. und Röhrborn, G.: Chromosome aberrations in pre-implantation stages of mice after treatment with triazoquinone. *Humangenetik* 18, 101-109 (1973).
- (70) Turan, Z.: Untersuchung der numerischen Chromosomenaberrationen in der Präimplantationsphase der Maus C3H. Diplomarbeit, ZLM, Universität Freiburg (1976).
- (71) Hansmann, I., Zmarsly, R., Probeck, H.D., Schäfer, J. und Jenderny, J.: Aneuploidy in mouse fetuses after paternal exposure to X rays. *Nature* 280, 228-229 (1979).
- (72) Max, C.: Cytological investigation of embryos in low-dose X-irradiated young and old female inbred mice. *Hereditas* 85, 199-206 (1977).
- (73) Strausmanis, R., Henrikson, I.B., Holmberg, M. und Rönnbäck, C.: Lack of effect on the chromosomal non-disjunction in aged female mice after low dose X-irradiation. *Mut. Res.* 49, 269-274 (1978).
- (74) Basler, A., Buselmaier, B. und Röhrborn, G.: Elimination of spontaneous and chemically induced chromosome aberrations in mice during early embryogenesis. *Hum. Genet.* 33, 121-130 (1976).
- (75) Boué, J.G. und Boué, A.: Increased frequency of chromosomal anomalies in abortions after induced ovulation. *Lancet* 1973, 679-680 (1973).

- (76) Yamamoto,M., Fujimori,R., Ito,T., Kamimura,K. und Watanabe, G.: Chromosome studies in 500 induced abortions. Humangenetik 29, 9-14 (1975).
- (77) Sachs,E.S., Jakoda,M.G.J., Niermeijer,M.F. und Galjaard,H.: An unexpected high frequency of trisomic fetuses in 229 pregnancies, monitored for advanced maternal age. Hum. Genet. 36, 43-46 (1977).
- (78) Dhadiyal,R.K., Machin,A.M. und Tait,S.M.: Chromosomal anomalies in spontaneously aborted human fetuses. Lancet 1970, 20-21 (1970).
- (79) Ruzicska,P. und Czeizel,A.: Cytogenetic studies on mid-trimester abortuses. Humangenetik 10, 273-297 (1970).
- (80) Jacobs,P.A.: Chromosome mutations: frequency at birth in humans. Humangenetik 16, 137-140 (1972).
- (81) Pawlowitzki,I.H.: Frequency of chromosome abnormalities in abortions. Humangenetik 16, 131-136 (1972).
- (82) Binkert,F. und Schmid,W.: Pre-implantation embryos of Chinese hamster. I. Incidence of karyotype anomalies in 226 control embryos. Mut. Res. 46, 63-76 (1977).
- (83) Yamamoto,M. und Ingalls,T.H.: Delayed fertilization and chromosome anomalies in the hamster embryo. Science 176, 518-521 (1972).
- (84) Witschi,E.: Teratogenic effects from overripeness of the egg. In: Fraser,F.C. und McKusick,V.A.(Hrsg.): Proc. 3rd Int. Conf., The Hague, 1969, S. 157-169. Excerpta Medica, Amsterdam (1969).
- (85) Graham,C.F.: Parthenogenetic mouse blastocysts. Nature 226, 165-167 (1970).
- (86) Tarkowski,A.K., Witkowska,A. und Nowicka,J.: Experimental Parthenogenesis in the mouse. Nature 226, 162-165 (1970).
- (87) Witkowska,A.: Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. I. Preimplantation development. J. Embryol. Exp. Morph. 30, 519-545 (1973).
- (88) Witkowska,A.: Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. II. Postimplantation development. J. Embryol. Exp. Morph. 30, 547-560 (1973).

- (89) Modlinski, J.A.: Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus.  
*J. Embryol. Exp. Morph.* 33, 897-905 (1975).
- (90) Kaufman, M.H. und Sachs, L.: The early development of haploid and aneuploid parthenogenetic embryos.  
*J. Embryol. Exp. Morph.* 34, 645-655 (1975).
- (91) Shaver, E.L. und Carr, D.H.: The chromosome complement of rabbit blastocysts in relation to the time of mating and ovulation.  
*Can. J. Genet. Cytol.* 11, 287-293 (1969).
- (92) Fraser, L.R., Zanelotti, H.M., Paton, G.R. und Drury, L.M.: Increased incidence of triploidy in embryos derived from mouse eggs fertilized in vitro.  
*Nature* 260, 39-40 (1976).
- (93) Niemierko, A.: Induction of triploidy in the mouse by cytochalasin B.  
*J. Embryol. Exp. Morph.* 34, 279-289 (1975).
- (94) Wroblewska, J.: Developmental anomaly in the mouse associated with triploidy.  
*Cytogenetics* 10, 199-207 (1971).
- (95) Gropp, A., Giers, D. und Kolbus, U.: Trisomy in the fetal backcross progeny of male and female metacentric heterozygotes of the mouse.  
*Cytogenet. Cell Genet.* 13, 511-535 (1974), und:  
Systematic approach to the study of trisomy in the mouse.  
*Cytogenet. Cell Genet.* 14, 42-62 (1975).
- (96) White, B.J., Tjio, J.-H., van de Water, L.C. und Crandall, C.: Trisomy 19 in the laboratory mouse. I. Frequency in different crosses at specific developmental stages and relationship of trisomy to cleft palate.  
*Cytogenet. Cell Genet.* 13, 217-231 (1974), und:  
Trisomy 19 in the laboratory mouse. II. Intra-uterine growth and histological studies of trisomics and their normal littermates.  
*Cytogenet. Cell Genet.* 13, 232-245 (1974).
- (97) Parry, J.M. und Zimmermann, F.K.: The detection of monosomic colonies produced by mitotic chromosome non-disjunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Mut. Res.* 36, 49-66 (1976).

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Bresch angefertigt, dem mein besonderer Dank für Aufgabenstellung und Betreuung der Arbeit gilt.

Herrn Dr. D. Wild möchte ich besonders für die vielfältige materielle Unterstützung und anregende Diskussionen danken. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. F. Binkert, Kinderspital Zürich, Abteilung Medizinische Genetik, für seine bereitwillige Hilfe bei der Bestimmung der fraglichen Chromosomenpräparate.

Für tatkräftige Unterstützung bei der grammatikalisch korrekten Ausformulierung der Arbeit danke ich herzlich Frau Doktorandin U. Niesert.

Für die Bereitstellung der für die Experimente benötigten Mäuse danke ich Herrn D. Harnasch.



## LEBENS LAUF

Am 15. März 1950 wurde ich, Zeki Turan, in Iğdır/Türkei als ältester Sohn von Muharrem Turan und seiner Frau Selma geboren. Von 1958 bis 1962 habe ich die Volksschule besucht. Danach setzte ich meine Ausbildung in der Mittelschule fort. Ich beendete sie 1965. Anschließend besuchte ich das Gymnasium, das ich 1968 mit dem Abitur abschloß. Danach machte ich eine Aufnahmeprüfung und studierte Biologie (Zoologie-Botanik) an der Universität von Ankara. Mein Studium konnte ich im Sommer 1972 mit dem Diplom erfolgreich abschließen.

Anschließend bekam ich nach einer Prüfung ein Stipendium vom Kultusministerium meiner Regierung und kam nach Deutschland, um meine Doktorarbeit zu machen. Zur Erlernung der deutschen Sprache besuchte ich im Jahre 1973-74 das Goethe-Institut in Göttingen und Boppard. Danach bewarb ich mich an der Universität Freiburg. Da mein türkisches Diplom nicht anerkannt wurde, mußte ich zuerst eine Kenntnisprüfung und anschließend eine experimentelle Diplomarbeit machen. Die Kenntnisprüfung 1975 und die experimentelle Diplomarbeit 1976 habe ich an der Fakultät für Biologie, Freiburg abgeschlossen. Danach habe ich meinen Militärdienst in der Türkei abgeleistet.

Im Januar 1978 habe ich mit der Durchführung der vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. C. Bresch begonnen.









